

Aus dem Pathologischen Institut
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Kirchner

Expression von TNFRS, ARTS und p16 im duktalem Adenokarzinom des Pankreas

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Karoline Koralie Fremerey
aus Stuttgart

2018

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Thomas Kösel

Mitberichterstatter: PD Dr. Marlies Michl
PD Dr. Jan D'Haese
Prof. Dr. Klaus Prechtel

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Rheinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 27.11.2018

Meiner Familie gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	S. 4
2. Ziele der Arbeit	S. 8
3. Methodik.....	S. 9
3.1. Patientendaten.....	S. 9
3.2. TMA-Herstellung	S. 9
3.3. Auswertung	S. 10
3.4. Immunhistochemie	S. 11
3.4.1. p16	S. 11
3.4.2. TNFRS.....	S. 12
3.4.3. ARTS.....	S. 13
3.5. Statistische Methoden	S. 15
4. Ergebnisse	S. 16
4.1. Klinische Daten der Patienten	S. 18
4.2. TNM-Klassifikation und Grading.....	S. 20
4.3. Expression der Biomarker	S. 21
4.4. Überlebenszeitanalyse	S. 25
4.4.1. Überleben in Abhängigkeit von klinischen Daten	S. 27
4.4.2. Überleben in Abhängigkeit von TNM-Klassifikation und Grading.....	S. 29
4.4.3. Überleben in Abhängigkeit von der Expression der Biomarker	S. 32
4.4.3.1. Alle Patienten	S. 32
4.4.3.2. Patienten mit minimaler Überlebenszeit 12 Monate	S. 35
4.4.3.3. Kombinationen der Biomarker	S. 38
4.5 Multivariate Analyse	S. 40
5. Diskussion	S. 42
6. Zusammenfassung	S. 49
7. Literaturverzeichnis	S. 51
8. Anhang	S. 60
8.1 Abkürzungsverzeichnis.....	S. 60
8.2 Danksagung	S. 61
8.3 Ehrenwörtliche Erklärung	S. 62

1. Einleitung

Das Pankreaskarzinom ist eine maligne Entartung des endo- oder exokrinen Pankreasgewebes, wobei die häufigste Form hierbei das duktale Adenokarzinom des Pankreas (PDAC) mit einem >85% Anteil ist (Pinho et al. 2014, Reid et al. 2014). Das PDAC hat das schlechteste Inzidenz-zu-Mortalität-Verhältnis aller Tumoren, wobei es die nur 12. häufigste Krebserkrankung ist (Siegel et al. 2017).

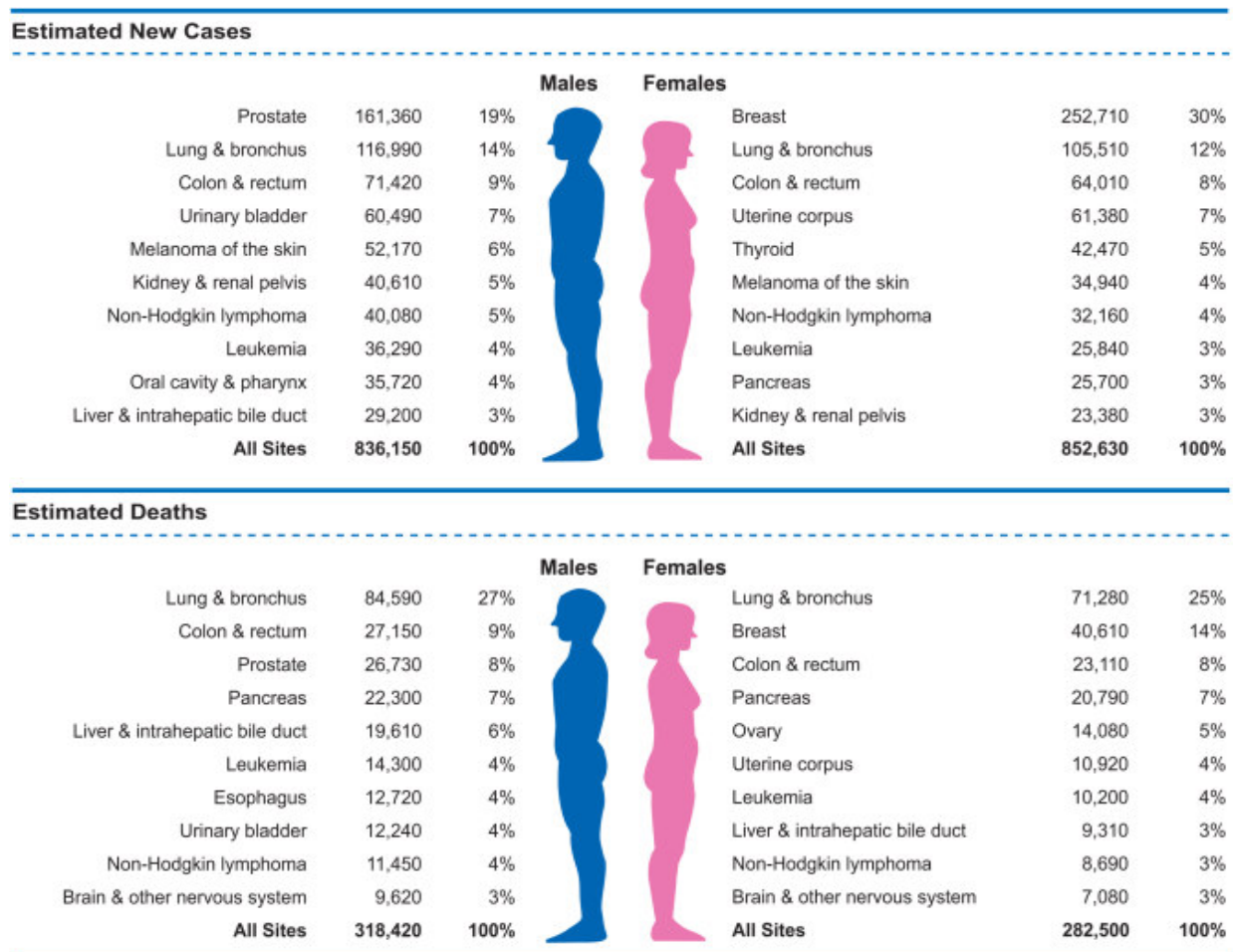


Abbildung 1: Prognostische Zahl der Neuerkrankung und Todesfälle der häufigsten Tumoren nach Geschlecht in den USA für 2017 (Siegel et al. 2017)

Die Zahl der Neuerkrankung beläuft sich auf 12,5 Fälle pro 100.000 und die Zahl der Toten beträgt 10,9 pro 100.000 (Howlader et al. 2017). Die äußerst niedrige 5-Jahres-Überlebensrate liegt dabei bei nur 8,2% (Howlader et al. 2017), so dass das PDAC weltweit auf Platz 5 der häufigsten Tumortodesfälle (Torre et al. 2015, Abb. 2) und in den USA sogar auf Platz 4 (Siegel et al. 2017, Abb.1) liegt.

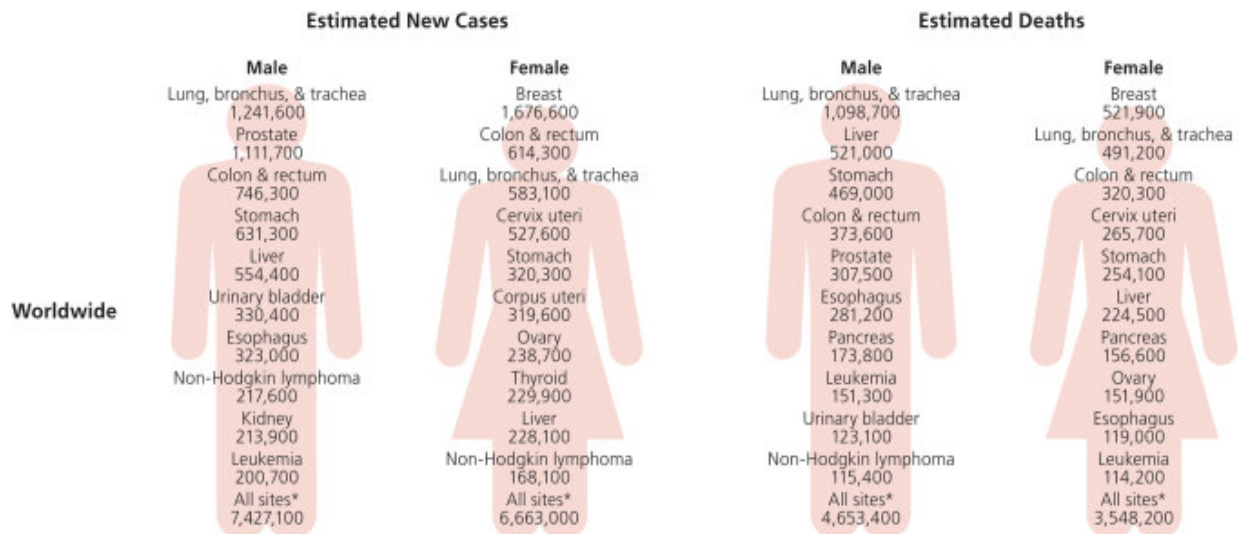


Abbildung 2: Geschätzte Anzahl an Neuerkrankungen und Todesfällen weltweit nach Geschlecht (Torre et al. 2015)

Das durchschnittliche Erkrankungsalter beträgt 70 Jahre, Männer sind häufiger betroffen als Frauen (Howlader et al. 2017). Folgende Faktoren sollen dabei die Entstehung eines PDACs fördern: Tabakkonsum, übermäßiger Konsum von Alkohol, akute und chronische Pankreatitis (vor allem die hereditäre Form), Adipositas und zahlreiche genetische Prädispositionen, zu denen vor allem das FAMMM-Syndrom (Familial Atypical Multiple Mole Melanoma Syndrom) zählt (Vrieling et al. 2010, Gapstur et al. 2011, Bosetti et al. 2012, Yadav et al. 2013, Piciocchi et al. 2015). Der Tumor befindet sich bevorzugt im Caput, weniger in der Cauda oder dem Corpus des Pankreas (Hezel et al. 2006). Die Lokalisation des Pankreas im tiefen Bauchraum und die erst im späteren Stadium eintretenden diffusen klinischen Symptome erschweren eine rechtzeitige Diagnose (Büchler et al. 2010). Desweiteren handelt es sich beim PDAC um ein aggressiv wachsendes Karzinom mit einer hohen Malignitätsrate, das früh lymphogen metastasiert und in das umliegende Gewebe infiltriert (Hezel et al. 2006, Williams et al. 2015). Zum Zeitpunkt der Erstdiagnose haben bereits 80 - 90% aller Patienten Metastasen entwickelt (Singh et al. 2011). Aus diesen Faktoren resultierend befindet sich das Karzinom zum Zeitpunkt der Erstdiagnose meistens in einem fortgeschrittenen Stadium und eine kurative Operation kann nur noch in 10-20% aller Fälle durchgeführt werden (Li et al. 2004, Singh et al. 2011, Versteijne et al. 2016).

Das PDAC ist histologisch durch heterogene, drüsenartige, atypische Strukturen gekennzeichnet. Es gibt unterschiedliche Dysplasiegrade, die durch die Architektur der Zellen und Kerne zuerkennen sind, wobei diese Auffälligkeiten auch innerhalb eines Tumors lokal variieren können (Hezel et al. 2006). Im internationalen Konsens werden bei der Graduierung folgende als signifikant erwiesene Parameter mit einbezogen: die glanduläre Differenzierung, die Muzinproduktion, die Mitoserate und die Zellkernanordnung (Lüttges et al. 2000, Neureiter et al. 2014). Die international anerkannte Stadieneinteilung erfolgt nach dem System des UICC (Union internationale contre le cancer). Diese berücksichtigt die TNM-Klassifikation sowie den Resektionsrand. Die prognostische Aussagekraft des UICC-Systems und der weiteren klinikopathologischen Parameter werden in der Literatur stark kontrovers diskutiert (Yachida et al. 2013). Das PDAC entsteht aus pankreatisch intraduktalen Neubildungen, kurz PanIN (Pankreatisch intraepitheliale Neoplasie) genannt. Diese non-invasiven Vorläuferläsionen werden in verschiedene Stadien unterteilt: PanIN 1A, PanIN 1B, PanIN 2B und PanIN C (Lüttges et al. 2000, Hurban et al. 2001, Maitra et al. 2003, Abb. 3).

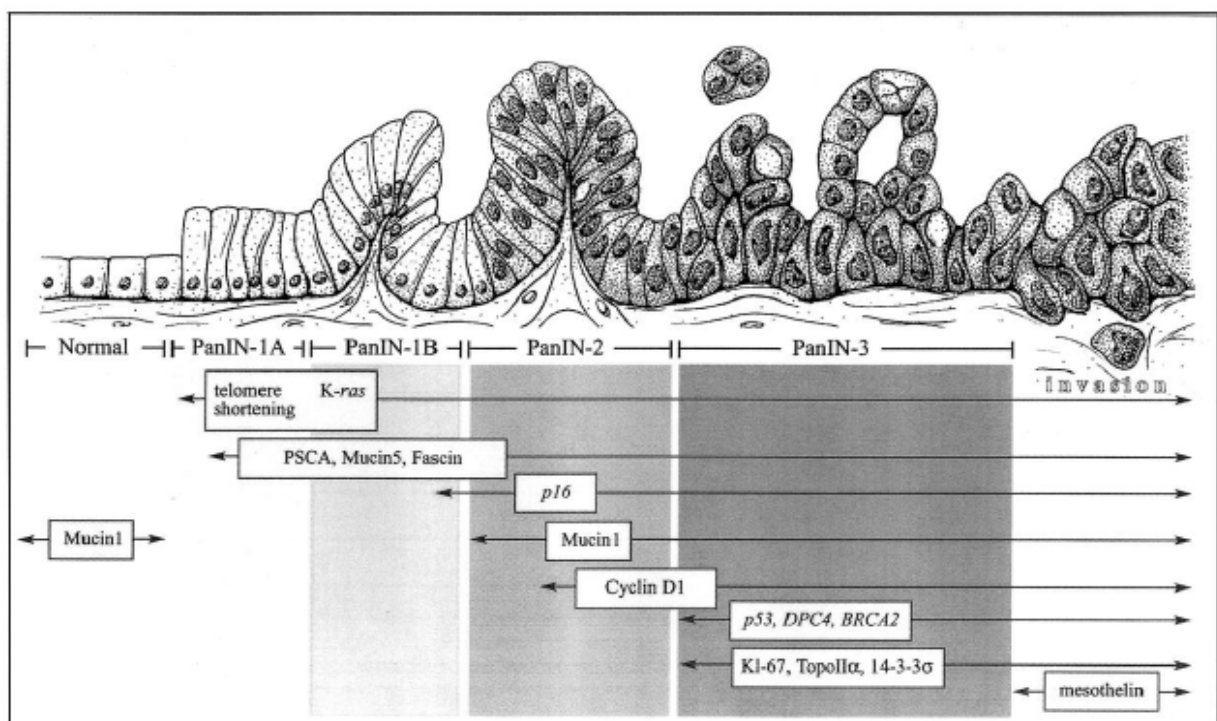


Abbildung 3: Entwicklung der PanIN-Vorläuferläsionen in Zusammenhang mit genetischen Aberrationen (Maitra et al. 2003)

Fast alle genetischen Aberrationen des Adenokarzinomes finden sich auch in diesen Vorläuferläsionen wieder, wobei angenommen wird, dass mit der Zunahme an bestimmten genetischen Alterationen auch der Dysplasiegrad und die Tumoraggressivität steigen (Hurban et al. 2001, Rosty et al. 2003, Biankin et al. 2003, Jones et al. 2008). Wenn hochgradige PanIN-Läsionen die Basalmembran durchbrochen haben und ins umgebende Gewebe infiltriert sind, bezeichnet man sie als PDAC. Sie haben sich von einem Carcinoma in situ zu einem Adenokarzinom entwickelt (Hezel et al. 2006). Jones et al. sequenzierten die Exone von 24 PDACs und stellten dabei fest, dass beim Pankreaskarzinom eine Vielzahl von Mutationen vor allem bei den 4 am häufigsten betroffenen Genen auftreten: KRAS (*v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*), CDKN2A/p16, TP53 (*encoding the p53 protein*) und SMAD4/DPC4 (*SMAD family member 4, also DPC4*) (Jones et al. 2008). Diese Ergebnisse unterstützen die Aussagen voran gegangener Studien und wurden durch weitere Studien belegt (Hurban et al. 2000, Maitra et al. 2003, Biakin et al. 2012, Oshima et al. 2013).

Neue diagnostische, prognostische und prädiktive Tumormarker sind von herausragender Bedeutsamkeit, um die hohen Mortalitätsraten des PDACs zu verbessern (Hamidov et al. 2011, Neureiter et al. 2014). Hierbei ist der Einsatz von Markern im Tumorgewebe oder im Blut im Rahmen der serologischen Früherkennung, die Korrelation von Malignitätsgrad und Metastasierung mit bestimmten Markern und deren Nutzung als Ansatz für eine medikamentöse Therapie von enormen wissenschaftlichen Interesse (Bogoevski et al. 2008).

2. Ziele der Arbeit

In dieser Arbeit haben wir:

- ein großes, gut charakterisiertes Tumorkollektiv erstellt
- den signifikanten Einfluss der klinikopathologischen Parameter auf das Überleben der an PDAC erkrankten Patienten ermittelt
- die Expression der Biomarker p16, TNFRS (OPG) und ARTS im duktalem Adenokarzinom des Pankreas mittels Gewebe-Mikroarray und Immunhistochemie untersucht
- die Auswirkungen auf das Lang- und Kurzzeitüberleben ($>/ < 12$ Monate) der Patienten im Zusammenhang mit der Expression der drei Biomarker betrachtet
- die Korrelation der Biomarker miteinander und den klinikopathologischen Parametern untersucht

3. Methodik

3.1. Patientendaten

Die Datensätze und Gewebeproben dieser Arbeit entstammen dem Tumorkollektiv der Universitätskliniken Jena, Regensburg und Dresden. Die Patientendaten der Universitäten wurden zu einem gemeinsamen Datensatz zusammengefasst. Die Tabellen beinhalteten folgende Angaben: Alter, Geschlecht, Herkunft, TNM-Klassifikation, UICC-Stadium, histologische Graduierung und Resektionsrandstatus.

3.2. TMA-Herstellung

Zur erleichterten und schnelleren Auswertung der Gewebeschnitte wurde ein Gewebe-Micro-Array (TMA= tissue-micro-array) angefertigt (Knösel et al. 2005, Cui et al. 2011). Die TMA-Herstellung und eine H&E-Färbung zum Nachweis von Tumorgewebe erfolgten nach standardisierten Bedingungen im Labor des pathologischen Institutes der Universitätsklinik Jena und im Labor der Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie Dresdens.

Aus den in Paraffin eingebetteten Gewebeproben wurde mit Hilfe eines Gewebe-Array-Stanzgeräts jeweils ein Zylinder des Tumorgewebes ausgestanzt. Im Empfängerblock, der auch aus Paraffin besteht, wurde ein gleich großer Zylinder entfernt, in den die Gewebeprobe eingebracht wurde. Von diesem TMA-Paraffinblock wurden Serienschnitte angefertigt. Diese wurden im Anschluss auf Objektträger aufgebracht und mit den jeweiligen Markern angefärbt. Die Anfärbung der TMAs mit den Biomarkern TNFRS und p16 wurden im pathologischen Institut des Universitätsklinikums Jena durchgeführt. Der Biomarker ARTS wurde im Labor der Poliklinik für Viszeral-, Thorax- und Gefäßchirurgie Dresdens angefärbt. Zu jedem Patienten aus Dresden gab es 3 Gewebeproben, in Regensburger Kollektiv sind es 2 und in Jena 1 pro Patient. Die immunhistochemische Färbung wurde nach Standardmethoden durchgeführt mit den Antikörpern gelistet in Tabelle 1 für ARTS, TNFRS und p16. Zunächst wurden die Stenzen entparaffiniert und anschließend die Proteinstruktur demaskiert, um die Bindung mit den spezifischen monoklonalen Antikörpern zu ermöglichen.

Die Gewebeproben wurden danach mit den Antikörpern inkubiert. Die Verdünnung, die Produktnummer sowie der Hersteller sind der Tabelle 1 zu entnehmen. Nach Spülung mit Leitungswasser wurde TBS (Tris Buffered Saline) in 20facher Verdünnung mit destilliertem Wasser aufgebracht. Im anschließenden Schritt wurde mit Primary Antibody Enhancer (Ultra Vision LP Kit) inkubiert. Nach erneuter Waschung wurde HRP-Polymer (Ultra Vision LP Kit) zugegeben. Nach Waschung folgte im fünften Schritt die Entwicklung mit 3,3' – Diaminobenzidin (DAB). DAB wirkt in Anwesenheit des Enzyms Peroxidase chromogen. Dadurch werden die Peroxidase und somit auch das Antigen sichtbar.

Tabelle 1: Antikörper der Immunhistochemie

Antigen	Hersteller	Produkt-Nummer	Verdünnung
ARTS	Chemicon	AB4512	1:100
TNFRS	LSBio	LS-B2078	1:50
p16	Diagnostic Biosystems	JC8 PDM 137	1:100

3.3. Auswertung

Die Auswertung fand per Computer mit Hilfe des npd.view-Programmes von Hamamatsu Version 1.1 27 statt. Dafür wurden die TMAs im Institut für Pathologie der Friedrich-Schiller-Universität mit Hilfe des Scanners „Nano Zoomer 2. OHT“ von Hamamatsu registriert und digitalisiert. Bei unklarer Diagnose wurde auf ein Mikroskop zurück gegriffen oder das TMA zur zweiten Meinung eingeschickt.

Das Grading erfolgte durch Einteilung der Farbintensität in einem 4-stufigem Score: 0= keine Färbung, 1= schwache Färbung, 2= moderat und 3= starke Färbung. Bei jedem Patienten wurden Median, Maximum, Minimum und Durchschnitt ermittelt. Bei der statistischen Auswertung wurde jeweils der Maximalwert der Expression der Patienten verwendet.

3.4. Immunhistochemie

3.4.1. p16

p16^{INK4} ist ein 16 kDa schweres Tumorsuppressorprotein, dass seine inhibitorische Funktion am G1/S-Phasen-Kontrollpunkt des Zellzyklus ausübt (Hezel et al. 2006, Li et al. 2012). Es wirkt als Hemmer der Cyclin-D abhängigen Kinasen CDK4 und CDK6 (Serrano et al. 1993). Die Aufgabe dieser Kinasen ist es die Mitglieder der Retinoblastom(Rb)-Familie durch Phosphorylierung zu aktivieren, damit diese den Übergang in die S-Phase einleiten (Cobrinik et al. 1992, Attri et al. 2005, Li et al. 2012). Beim Funktionsverlust von p16^{INK4} fehlt somit dem Zellzyklus ein wichtiger Regulator und resultiert in der Entstehung von malignen Tumoren vieler Organe wie dem Kolon, der Leber, der Lunge, Weichgewebetumoren und der Mamma (Chang et al. 2010, Kriegl et al. 2011, Wang et al. 2012, Tam et al. 2013, Knösel et al. 2014). Auch beim PDAC ist der Expressionsverlust von p16^{INK4} ein initialer Schritt im Prozess der Kanzerogenese (Li et al. 2012). Hierbei kommt es durch Punktmutation, Deletion innerhalb des Genes oder Hypermethylierung des Promoters in 80% - 98% zu einer Veränderung des p16-Genlocus (Schutte et al. 1997, Rozenblum et al. 1997, Attri et al. 2005, Singh et al. 2011, Shao et al. 2014). Der genetische Abschnitt von p16^{INK4} liegt auf dem CDKN2a-Locus des Chromosoms 9p21, der für 2 Tumorsuppressorproteine codiert: p16^{INK4} und p14^{ARF} (Serrano et al. 1993). Patienten, die unter dem genetisch vererbaren FAMM-Syndrom leiden und somit Mutationen im Tumorsupressorgen INK4 aufweisen, besitzen ein 13-fach erhöhtes Risiko einen Pankreaskarzinom zu entwickeln (Goldstein et al. 2004, Lynch et al. 2010). Obwohl die beiden Tumorsuppressorproteine p16^{INK4} und p14^{ARF} auf dem gleichen Genlocus liegen, betrifft die erwähnte Genveränderung interessanterweise bevorzugt p16^{INK4} (Rozenblum et al. 1997). Der Expressionsverlust von p16 findet bereits ab dem Stadium PanIn2 der Vorläuferläsionen des PDACs statt: Je höher der Grad der Dysplasie, desto geringer die Expression von p16^{INK4} und die Kontrolle über den physiologischen Ablauf der Zellproliferation (Moskaluk et al. 1997, Fukushima et al. 2002, Oshima et al. 2013). Somit ist der Funktionsverlust von p16^{INK4} als Tumorsuppressorprotein ein Schlüssel an der Schwelle zu höher gradigen Dysplasien und somit bei der Tumorentstehung (Hezel et al. 2006, Chang et al. 2014).

3.4.2. TNFRS (OPG)

Osteoprotegerin (OPG) ist ein Mitglied der Tumor-Nekrosen-Faktor(TNF)-Rezeptor-Superfamilie (TNFRSF) und trägt somit auch die Bezeichnung TNFRS11B (Emery et al. 1998, Kanzaki et al. 2013). TNFRSF-Mitglieder sind an vielen Prozessen im Körper beteiligt vor allem jedoch an der Apoptose und der Entzündungsreaktion (Kwon et al. 2003, Sedy et al. 2015). Als einziges Mitglied dieser Gruppe verfügt OPG jedoch nicht über die für die Bindung von TNF wichtige transmembranöse Domäne und wird außerdem in die extrazelluläre Matrix sezerniert (Yonou et al. 2007, Zauli et al. 2008). OPG hauptsächlich bekannt für seine Schlüsselrolle in der Knochenhomöostase besitzt zusätzlich die Funktion TRAIL ein proapoptotisches Protein zu binden und somit die Apoptose zu verhindern (Weichhaus et al. 2014).

OPG besetzt eine Schlüsselrolle im RANK/RANKL/OPG-System, welches maßgeblich am Knochenauf- und -abbau beteiligt ist (Corey et al. 2005, Cody et al. 2013). Das transmembranöse Protein RANKL bindet normaler Weise an seinen Rezeptor RANK und regt durch eine Signalkaskade Stammzellen zur Osteoklastendifferenzierung an (Lacey et al. 1998, Rafiei et Komarora 2013). OPG hingegen wirkt als Pseudorezeptor von RANKL und verhindert durch dessen Bindung die Osteoklastendifferenzierung, es kommt so zu Osteopetrosis (Simonet et al. 1997, Chen et al. 2006, Rafiei et Komarora 2013). In vielen Studien wurde ein verändertes RANKL/OPG-Verhältnis in Tumorarten mit einer hohen Knochenmetastasierungsrate nachgewiesen, wie beispielsweise bei Brust- und Prostatakarzinomen (Armstrong et al. 2008, Cody et al. 2013, Rafiei et Komarora 2013, Ney et al. 2013). Die antiapoptotische Funktion von OPG ist gegeben durch die Fähigkeit ein weiteres Mitglied der TNFR-Superfamilie inhibitorisch zu binden: TRAIL (Tumor Nekrosis Factor Related Inducin Ligand), einem proapoptotischen Protein (Emery et al. 1998, Zauli et al. 2009). Aktiviertes TRAIL leitet durch Bindung an seine Rezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 über die Kaspasen 3, 6, 7 und 8 den Zelltod ein und ist der wichtigste Mediator der extrinsischen Apoptose (Lane et al. 2013). Die TRAIL-induzierte Apoptose findet in vielen Karzinomen statt und verschont weitestgehend gesunde Zellen (Yagita et al. 2004, Holoch et al. 2009, Stuckey et al. 2013).

Dieser intensiv erforschte Therapieansatz hat jedoch bei vielen Tumorarten das Problem, dass Tumorzellen eine Resistenz gegen TRAIL entwickeln (Tsukamoto et al. 2011). Einige Studien konnten belegen, dass OPG die TRAIL-induzierte Apoptose blockiert und somit das Überleben der Tumorzelle sichert (Emery et al. 1988, Holen et al. 2002). In diesem Zusammenhang ist die erhöhte OPG-Sekretionsrate der Tumorzellen vor allem in Prostata-, Mama- und Kolon-Karzinomen zu erklären (Holen et al. 2002, Neville-Webbe et al. 2004, Goncharenko-Khaider et al. 2010). Auch im Pankreas stellten Satoh et al. in einer in-vitro Studie fest, dass 60% aller im Stadium 4 befindlichen PDAC Osteoprotegerin exprimiert haben, während die gesunden Zellen keine erhöhte Expressionsrate aufwiesen (Satoh et al. 2001). Deswegen entwickelt auch das PDAC eine Resistenz gegen TRAIL (Sahu et al. 2011, Yuan et al. 2013). Kanzaki et al. haben in ihrer Studie beweisen können, dass eine Verminderung des OPG-Serumspiegels in einem besseren Ergebnis der TRAIL-basierten Therapie resultiert (Kanzaki et al. 2013). Beide Funktionen von OPG könnten für die Entstehung eines PDAC relevant sein, da das PDAC mit einer variierenden Wahrscheinlichkeit von 5-20% Knochenmetastasen bildet (Hatfield et al. 1976, Iguchi et al. 2004, Borad et al. 2009). Die Rolle von OPG in der Tumorentstehung des PDACs ist jedoch bis heute nicht genügend erforscht (Kanzaki et al. 2013). Auch die Bedeutung der signifikant erhöhten OPG-Blutserumwerte bei Pankreaskarzinompatienten ist noch ungeklärt (Lipton et al. 2002, Brand et al. 2011).

3.4.3. ARTS

ARTS (Apoptosis-related-protein in the TGF-beta signaling pathway) ist ein proapoptotisches Tumorsuppressorprotein und gehört zur Familie der IAP-Antagonisten (Gottfried et al. 2004). Diese Gruppe von Proteinen leiten durch inhibitorische Bindung der IAPs an ihr N-terminales Ende (IBM= IAP-bindendes Motiv) die Apoptose ein (Shi et al. 2004).

Inhibitoren der Apoptotischen Proteine (=IAPs) sind hingegen eine Familie von Proteinen, die durch Inhibierung proapoptotischer Kaspasen das Überleben der Zelle sichern (Salvesen et Duckett 2002, Garcia-Fernandez et al. 2010). Das im Zytosol befindliche XIAP ist das Stärkste der bekannten IAPs. Es enthält 3 BIR-Domänen, mit denen es die Kaspasen 3, 7 und 9 permanent an sich bindet und damit den in- und extrinsischen Apoptoseweg blockiert (Ryoo et al. 2000, Steller et al. 2008).

Aufgrund seiner Funktion konnte in vielen Studien ein erhöhtes Level von XIAP in verschiedenen Tumoren nachgewiesen werden (Eckelmann et al. 2006, Krepela 2009, Zhou et al. 2013). XIAP sowie weitere IAPs wurden von verschiedenen Studien als potentiell Ziel in der Tumorthherapie erforscht (Vince et al. 2007, Schile et al. 2008, Katragadda et al. 2013).

ARTS ist an der äußeren Mitochondrienmembran lokalisiert. Durch Apoptosesignale induziert diffundiert es in das Zytosol (Edison et al. 2012). Dort bindet es an die BIR3-Domäne von XIAP und aktiviert dadurch indirekt die Kaspasen 3, 7 und 9, die die Apoptose einleiten (Garrison et al. 2011, Bornstein et al. 2012). Die typische IBM-Stelle der IAP-Antagonisten fehlt ARTS (Edison et al. 2012). Gottfried et al. konnten in ihrer Studie jedoch ein 27 Basen langes Stück am C-Terminus nachweisen, mit dem es XIAP trotzdem an sich binden kann (Gottfried et al. 2004). Auf genetischer Ebene handelt sich bei ARTS um eine durch Splicing entstehende Variante des Sept4-Genes (Larisch et al. 2000, Gottfried et al. 2004). Somit Mitglied der Septin-Familie ist ARTS durch seine Funktion als Tumorsupressor und die Möglichkeit der IAP-Bindung einzigartig in dieser für die Zytoskelettauf- und -abbau bekannten Gruppe (Larisch et al. 2000, Macara et al. 2002). ARTS wurde ursprünglich in einer Studie auf der Suche nach Genen entdeckt, die induziert von TGF- β Apoptose auslösen (Larisch et al. 2000). Später wurde in verschiedenen Studien nachgewiesen, dass ARTS durch weitere Signale getriggert den Zelltod auslöst (Elhasid et al. 2004, Gottfried et al. 2004). Fuchs et al wiesen in ihrer Studie nach, dass ARTS auch für die Apoptose in Stammzellen zuständig ist (Fuchs et. al 2013).

Mehrere Studien haben einen Zusammenhang zwischen vermindertem ARTS-Level und der Malignität von Tumoren nach gewiesen: Elhasid et al. haben in ihrer Studie beweisen können, dass in akuter lymphatischer Leukämie die Expression von ARTS verloren geht (Elhasid et. al 2004). Sept4/ARTS defizitäre Mäuse haben ein beschleunigtes Tumorstadium (Garcia-Fernandez et al. 2010). Lee et al. haben in ihrer Studie jedoch keinen Zusammenhang zwischen der Mutation des P-Loops im ART-Gen und der Tumorentstehung im Magen, der Lunge oder der Leber nachweisen können (Lee et. al 2006). Über den Zusammenhang von ARTS im PDAC gibt es keine uns bekannten Studien.

3.5. Statistische Methoden

Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe der „SPSS für Windows“ Software Version 19 (SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA). Verteilungsunterschiede wurden mittels χ^2 -Test bestimmt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ angesehen. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Methode berechnet. Startzeitpunkt für die Berechnung der Überlebensraten war das Diagnosedatum. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich die beobachteten (rohen) Raten für das Überleben berechnet. Bei dieser Methode wird lediglich der Tod des Patienten als Zielereignis gewertet. Die Kaplan-Meier-Überlebensraten wurden mittels log Rank Test verglichen. Für die multivariate Analyse wurde ein Cox-Regressionsmodell (schrittweise vorwärts) berechnet.

4. Ergebnisse

Es standen 395 Datensätze aus den Kliniken Regensburg, Jena und Dresden zu Verfügung.

Tabelle 2: Übersicht über die verfügbaren Daten

	Gültig	Fehlend	Prozente
Ort	395	0	0,00%
Tod	355	40	10,13%
Adenokarzinom	371	24	6,08%
Sex	358	37	9,37%
Alter in Jahren	358	37	9,37%
pT	354	41	10,38%
pN	353	42	10,63%
M	358	37	9,37%
G	346	49	12,41%
Stadium	351	44	11,14%
R	349	46	11,65%
p16	360	35	8,86%
TNFRS	364	31	7,85%
ARTS	365	30	7,59%

Im Durchschnitt fehlte bei etwa 10% eines der für die Analyse erforderlichen Merkmale. Als unverzichtbar wurden alle Merkmale in der Tabelle außer Graduierung und p16 angesehen, wobei in der Mehrzahl mehr als ein Merkmal fehlte.

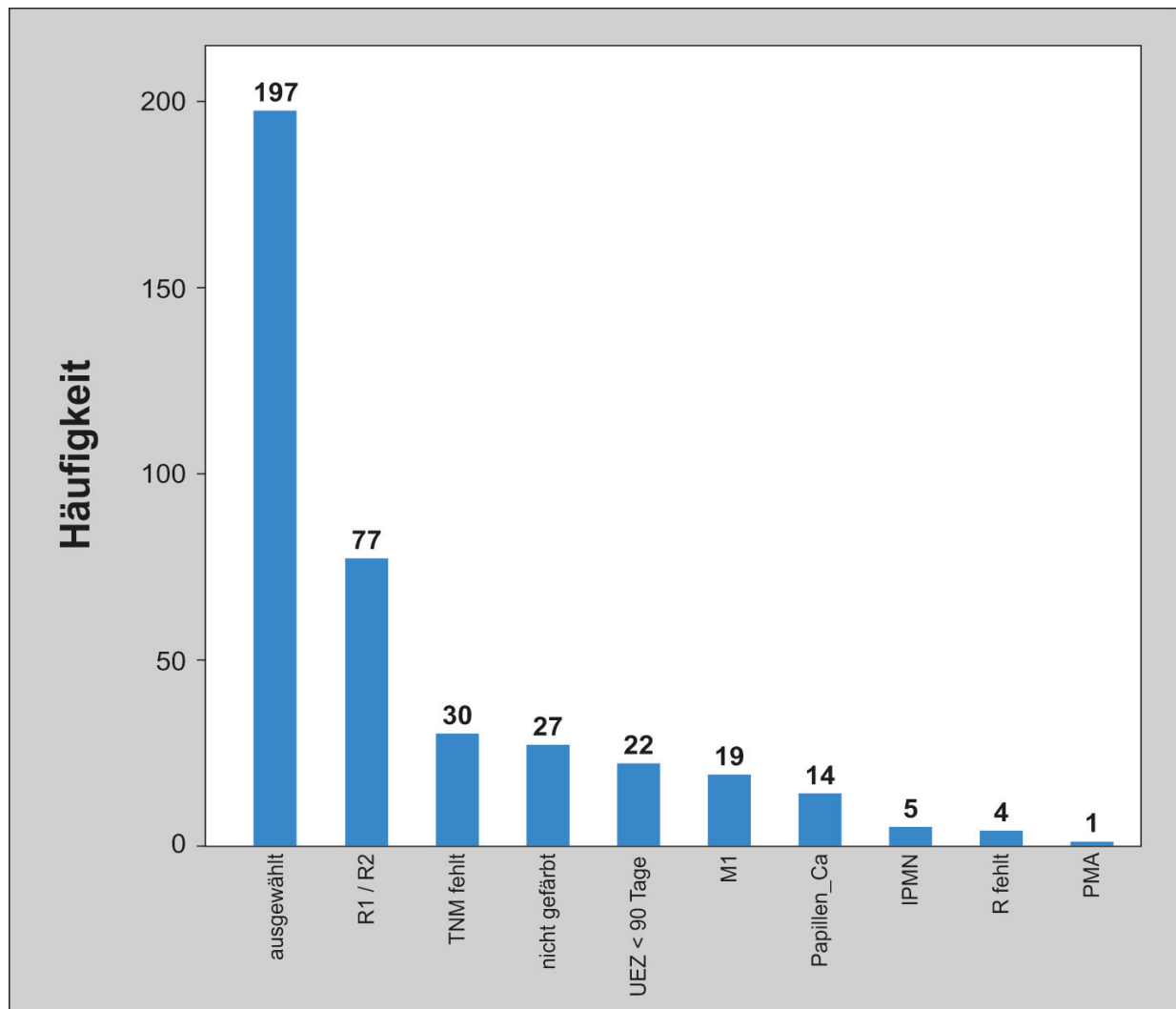


Abbildung 4: Gründe für den Ausschluss aus der definitiven Analyse bei der Überlebenszeitprognose

Aus der Analyse und Korrelation der klinischen Daten und der Expression der Biomarker wurden alle fehlenden Werte ausgeschlossen, so dass 292 Datensätze übrig blieben. Als unzulässig galten alle Gewebeproben, die kein pankreatisch duktales Adenocarcinoma waren ($n=24$), keine TNM-Klassifikation besaßen ($n=30$) oder auf Grund fehlender Färbung nicht auswertbar waren ($n=27$). Desweiteren wurden alle TMAs nicht gewertet, bei denen die Patienten eine UEZ < 90 Tage postoperativ aufwiesen, da dies als postoperative Mortalität gewertet wird. Hinzuzufügen ist, dass 5 Werte bei der Graduierung und 3 Werte bei der prozentualen Färbung von p16 fehlen. Bei den Überlebenszeitanalysen wurden zusätzlich alle Werte von R1 ($n=9$), R2 ($n=2$) und M1 ($n=19$) auf Grund der nicht aussagekräftigen Fallzahl ausgeschlossen, so dass das Patientenkollektiv hier 197 Patienten beinhaltete.

4.1. Klinische Daten der Patienten

Tabelle 3: Übersicht über die klinischen Daten der Patienten

		Häufigkeit	Prozent (%)
Herkunft	Jena	113	38,7
	Regensburg	71	24,3
	Dresden	108	37,0
Geschlecht	männlich	156	53,4
	weiblich	136	46,6
Alter in Jahren	<65 Jahre	132	45,2
	65 Jahre und älter	160	54,8
Tod	lebt	37	12,7
	tot	255	87,3

Die Gesamtzahl aller Patienten betrug 292 Fälle nach Ausschluss fehlender Merkmale. In unserem Kollektiv befanden sich 113 Patienten aus Jena, 71 aus Regensburg und 108 aus Dresden, was eine Verteilung von 38,7% aus Jena, 24,3% aus Regensburg und 37% aus Dresden bedeutete. 53,4% der Patienten sind Männer, 46,6% waren weiblich. Bei der Altersverteilung waren 45,2% Patienten in unserem Kollektiv jünger als 65 und 54,8% 65 Jahre alt oder älter. Bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung lebten noch 12,7% der Patienten, welches eine Sterberate von 87,3% bedeutet.

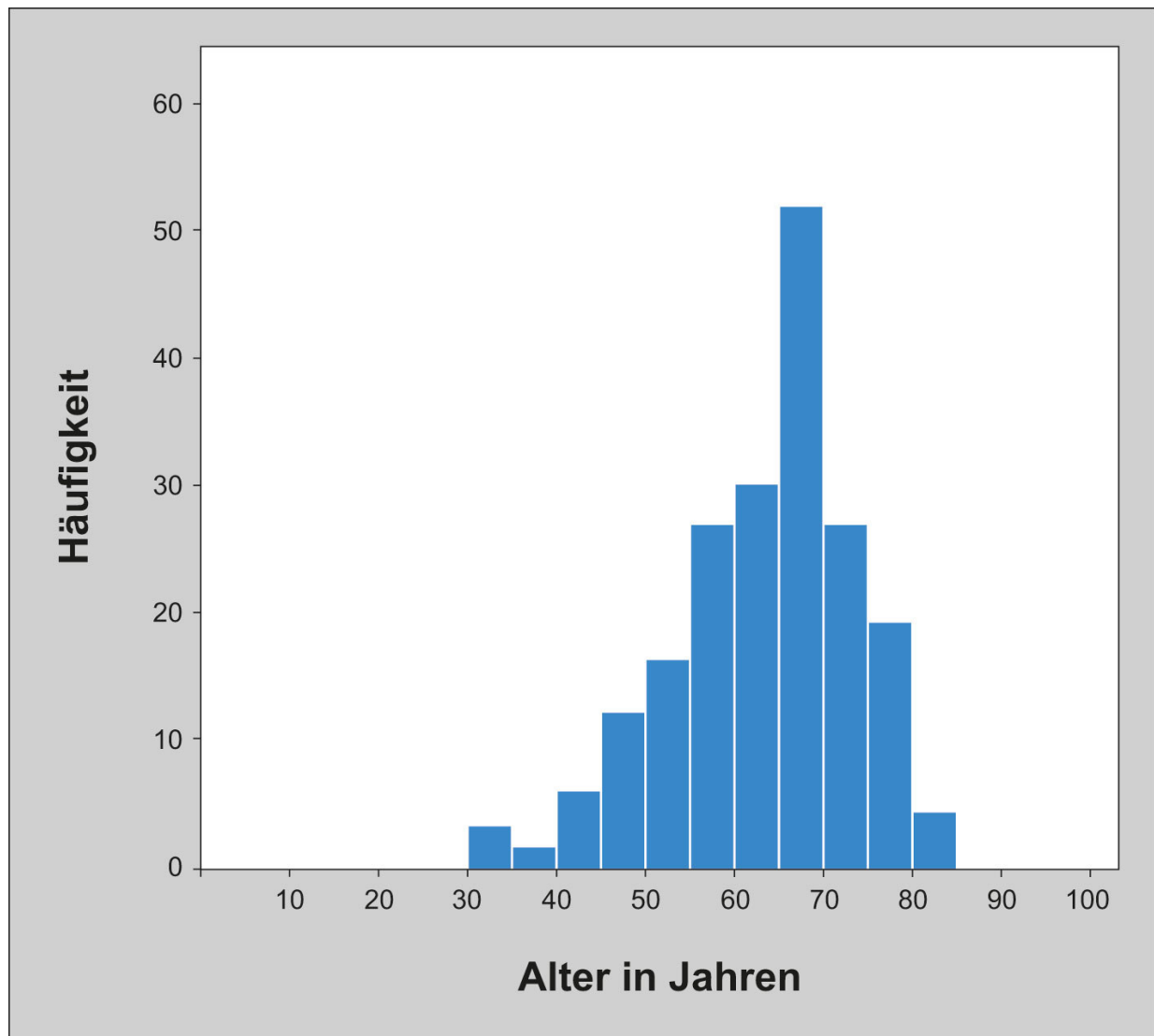


Abbildung 5: Altersverteilung des Patientenkollektives

Die Altersverteilung unseres Patientenkollektives zeigt auf, dass das Maximum bei 85 Jahren und das Minimum bei 32 Jahren lagen. Der Altersmedian unserer Patienten betrug 65 Jahre.

4.2. TNM-Klassifikation und Grading

Tabelle 4: Übersicht über die Ergebnisse der pathologischen Begutachtung

Graduierung	G1	14	4,8%
	G2	115	39,4%
	G3	157	53,8%
	G4	1	0,3%
	fehlend	5	1,7%
M	M0	273	93,5%
	M1	19	6,5%
pT	pT1	6	2,1%
	pT2	50	17,1%
	pT3	228	78,1%
	pT4	8	2,7%
pN	pN0	94	32,2%
	pN1	198	67,8%
Stadium	Stadium I	18	6,2%
	Stadium II	249	85,3%
	Stadium III	6	2,1%
	Stadium IV	19	6,5%
R-Klassifikation	R0	222	76,0%
	R1	49	16,8%
	R2	21	7,2%

Insgesamt standen bei der pathologischen Begutachtung von der Graduierung und der TMN-Klassifikation 292 Patienten zur Verfügung. Bei der histologischen Graduierung befanden sich die meisten Patienten im Stadium 2 (n=115) oder 3 (n=157), wobei anzumerken ist, dass 5 Werte fehlten. Nur 19 Patienten (n=6,5%) wiesen zur Zeit der Diagnose bereits Fernmetastasen auf, dafür hatten bereits 67,8% einen Lymphknotenbefall (n=198). Die Tumorgöße war in 80,8% der Fälle schon im T3- (n=228) oder T4- (n=8) Stadium. Bei 76% der Patienten war postoperativ kein mikroskopischer Rest des PDACs nachweisbar (R0=222). Bei der Überlebenszeitanalyse wurden wegen zu geringer Fallzahl R1/R2 und M1 ausgegliedert.

4.3. Expression der Biomarker

Bei der Expression der Biomarker wurde in einem 4-stufigem Score die Farbintensivität ermittelt:

0= keine Färbung, 1= schwache Färbung, 2= moderat und 3= starke Färbung.

Hierbei handelte es sich bei allen Biomarkern um zytosolische Färbungen.

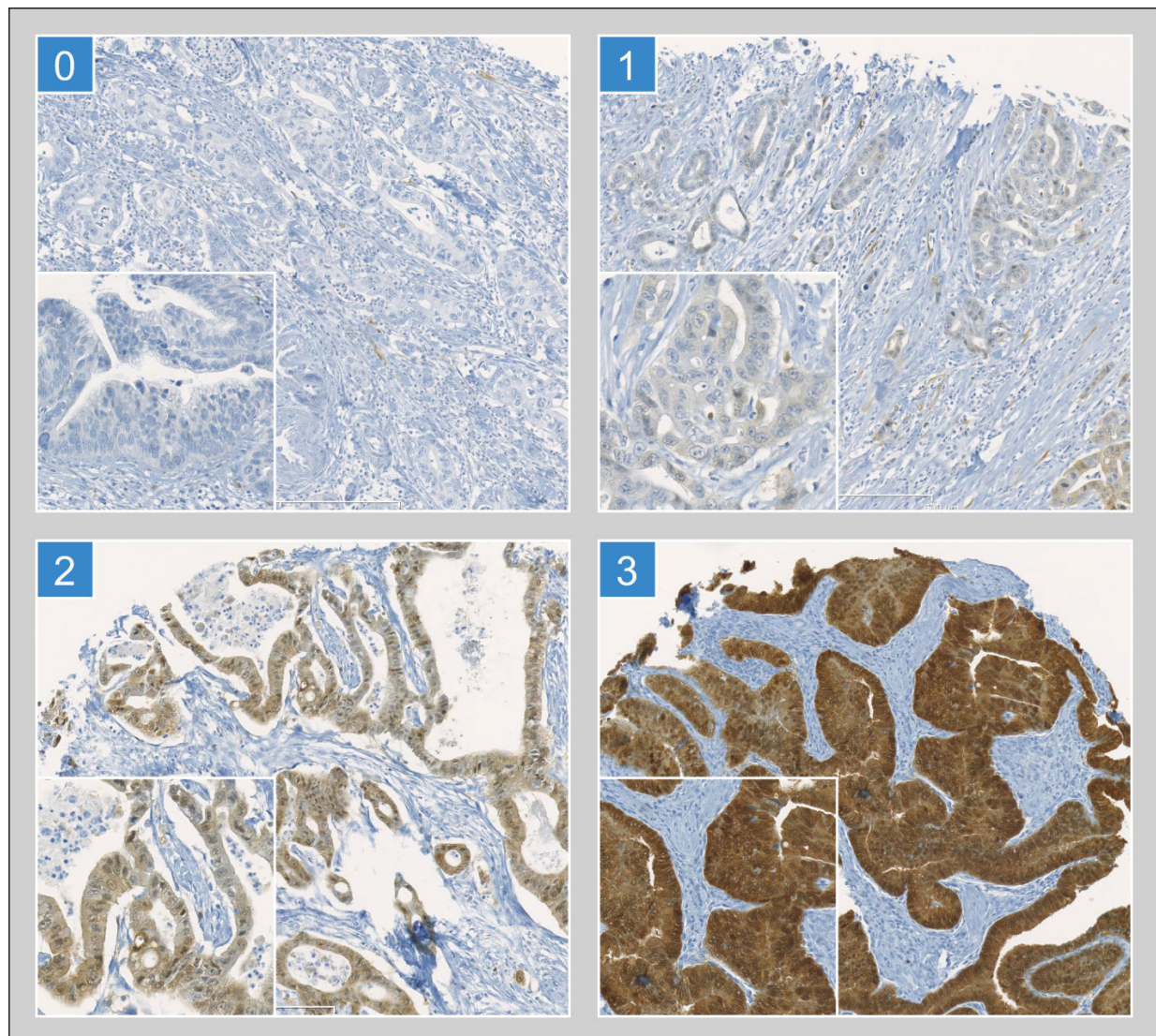


Abbildung 6: Immunhistologie p16

Auswertung der Expression des Biomarkers p16

0= keine Färbung, 1= schwache Färbung,

2= moderat und 3= starke Färbung

(Bildherstellung mit npd.view von Hamamatsu,

10-fache bzw. 20-fache Vergrößerung)

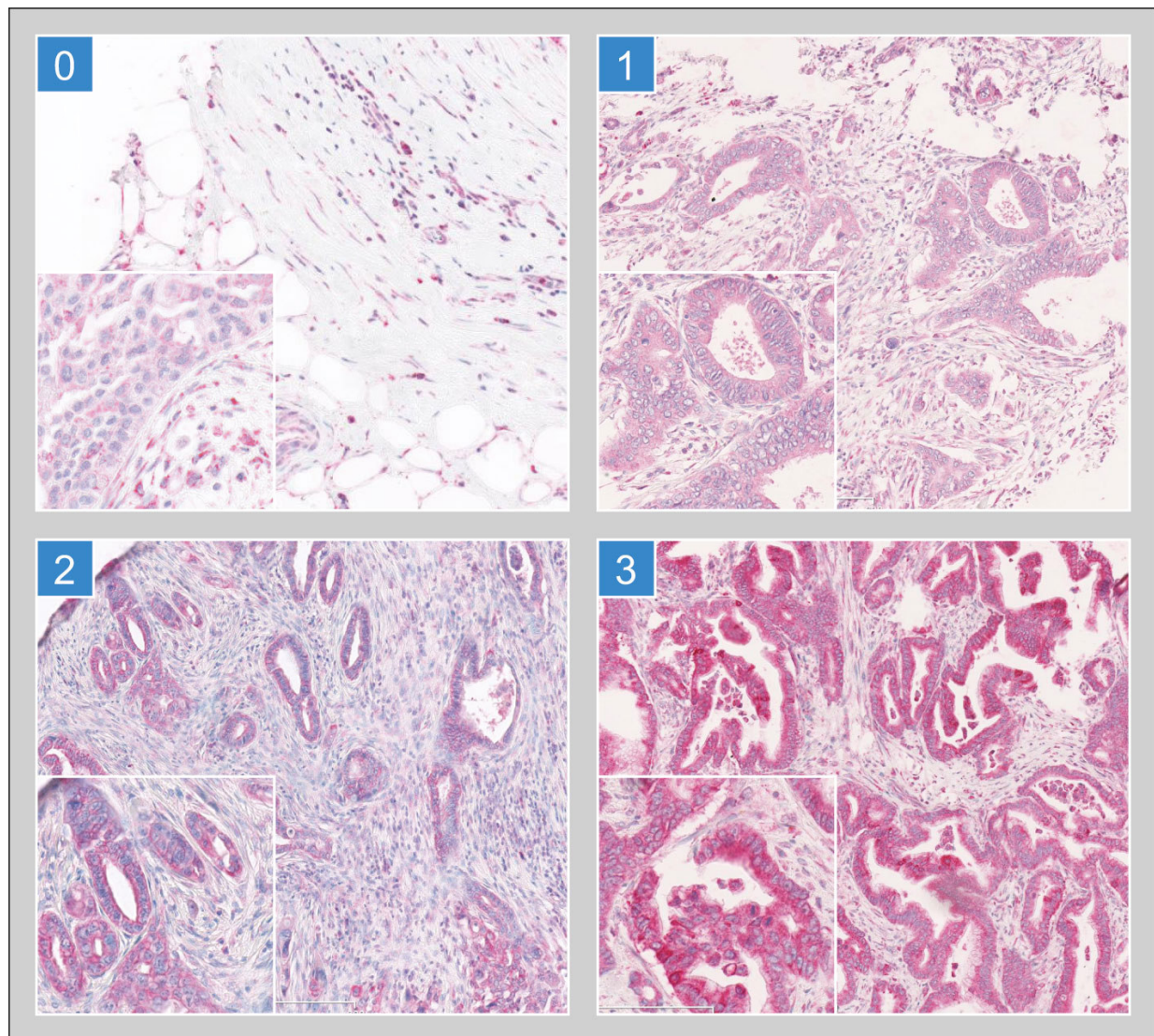


Abbildung 7: Immunhistologie TNFRS (OPG)

Auswertung der Expression des Biomarkers TNFRS (OPG)

0= keine Färbung, 1= schwache Färbung,

2= moderat und 3= starke Färbung

(Bildherstellung mit npd.view von Hamamatsu,

10-fache bzw. 20-fache Vergrößerung)

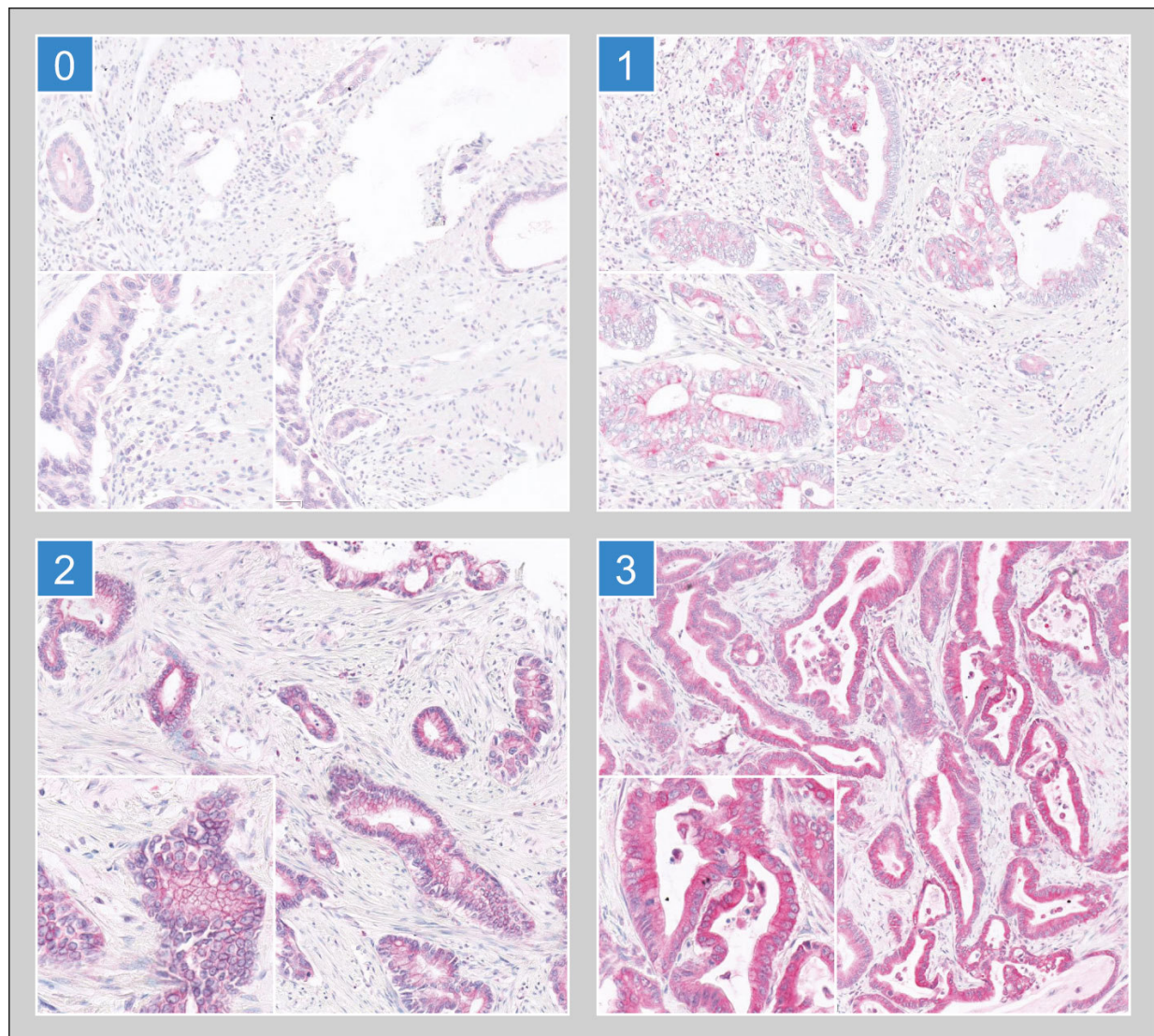


Abbildung 8: Immunhistologie ARTS

Auswertung der Expression des Biomarkers ARTS

0= keine Färbung, 1= schwache Färbung,

2= moderat und 3= starke Färbung

(Bildherstellung mit npd.view von Hamamatsu,

10-fache bzw. 20-fache Vergrößerung)

Tabelle 5: Expression der Biomarker p16, TNFRS(OPG), ARTS

	Expressionsgrade	Absolute Anzahl	Prozentualer Anteil
p16-Expression	0	202	69,2
	1	46	15,8
	2	33	11,3
	3	11	3,8
p16-Prozente (nach Remmele)	0	202	69,2
	1	32	11,0
	2	32	11,0
	3	23	7,9
	fehlend	3	1,0
TNFRS-Expression	0	4	1,4
	1	131	44,9
	2	135	46,2
	3	22	7,5
ARTS-Expression	0	20	6,8
	1	131	44,9
	2	116	39,7
	3	25	8,6

Bei p16 zeigten 69,2% der Fälle (n=202) keine Expression (Score 0). Bei TNFRS und ARTS wurde etwa die Hälfte nicht oder minimal (Score 1/2) angefärbt und die andere Hälfte mittelmäßig oder stark (Score 2/3).

4.4. Überlebenszeitanalyse

Bei der uni- und multivariaten Analyse wurden alle Fälle ausgeschlossen, bei denen die Überlebenszeit postoperativ weniger als 90 Tage betrug, weil dieses als perioperatives Versterben gewertet wird. Desweiteren wurden bei der Überlebenszeitanalyse wegen zu geringer Fallzahl R1/R2 und M1 ausgegliedert.

Die 5-Jahres-Überlebensrate aller 197 Patienten der Gesamtgruppe beträgt $8 \pm 2\%$ bei einer medianen Überlebenszeit von 15 Monaten.

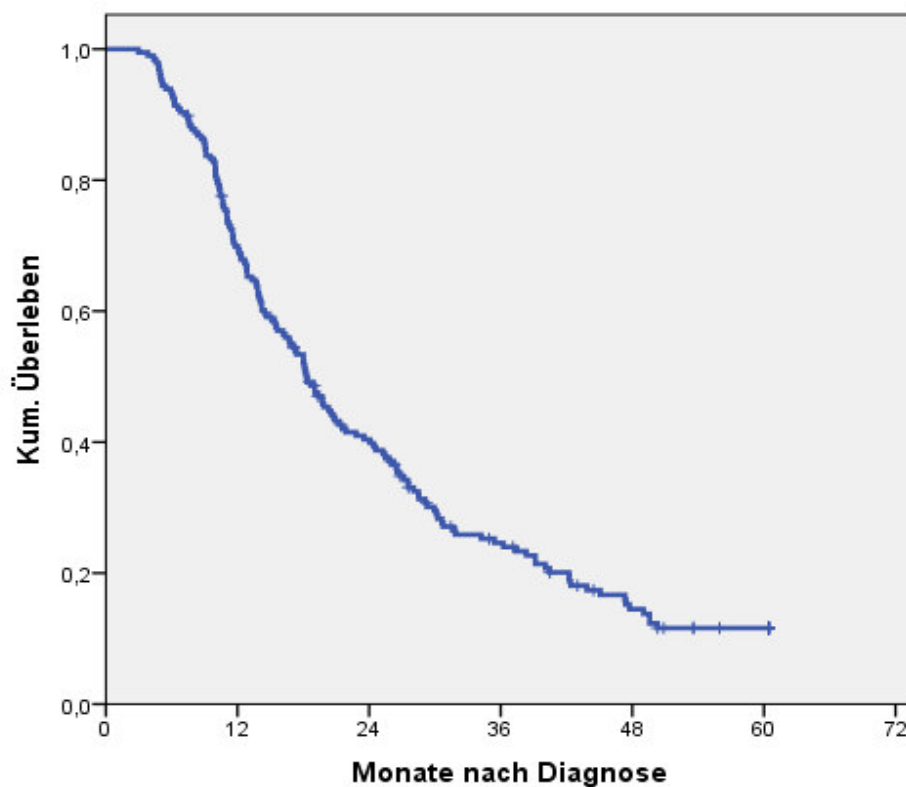


Abbildung 9: 5-Jahres-Überlebensrate

Tabelle 6: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit vom Ort

Ort	Gesamtzahl
Jena	93
Regensburg	43
Dresden	61
Gesamt	197

93 Patienten stammten aus Jena, 43 aus Regensburg und 61 aus Dresden, so dass der Patientenpool 197 Patienten umfasst. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Patienten der drei Kliniken und der Überlebensrate.

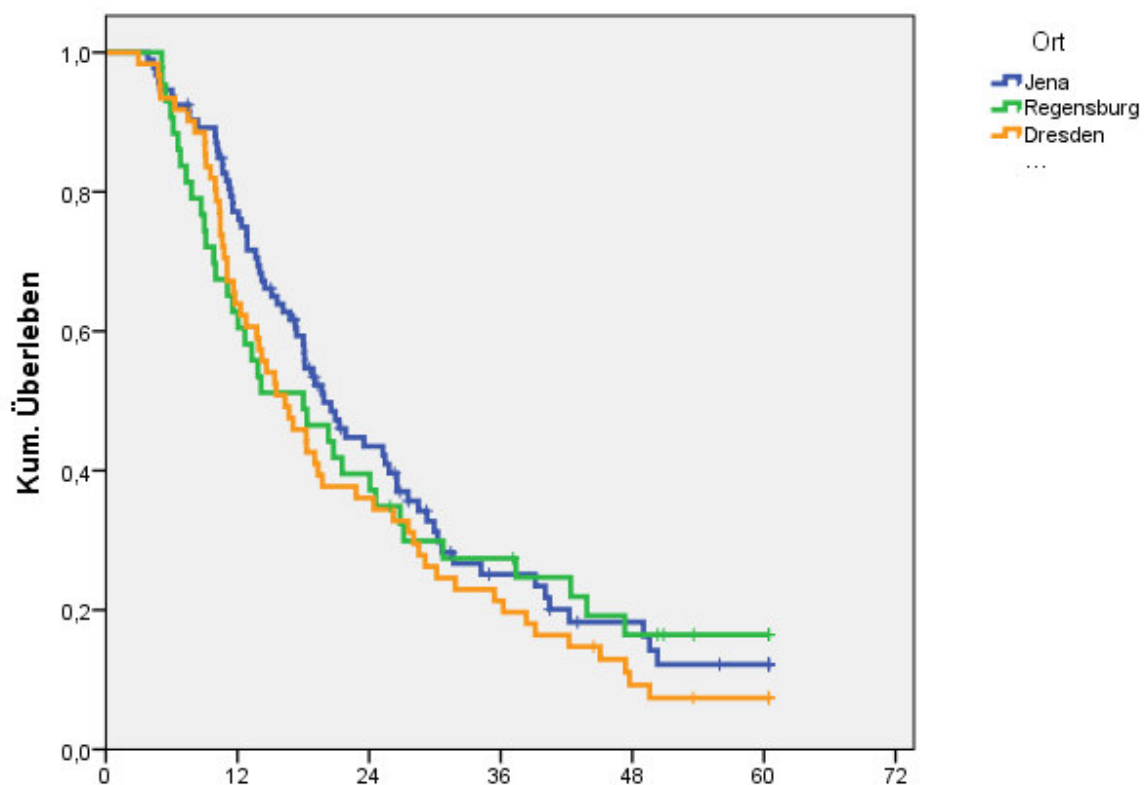


Abbildung 10: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zum Ort

4.4.1. Überleben in Abhängigkeit von klinischen Daten

Tabelle 7: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht

Geschlecht	Gesamtzahl
männlich	104
weiblich	93
Gesamt	197

Bei einer Gesamtfallzahl von 197 Fällen sind 52,8% (104) der Patienten männlich, 47,2% sind weiblichen Geschlechtes. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz.

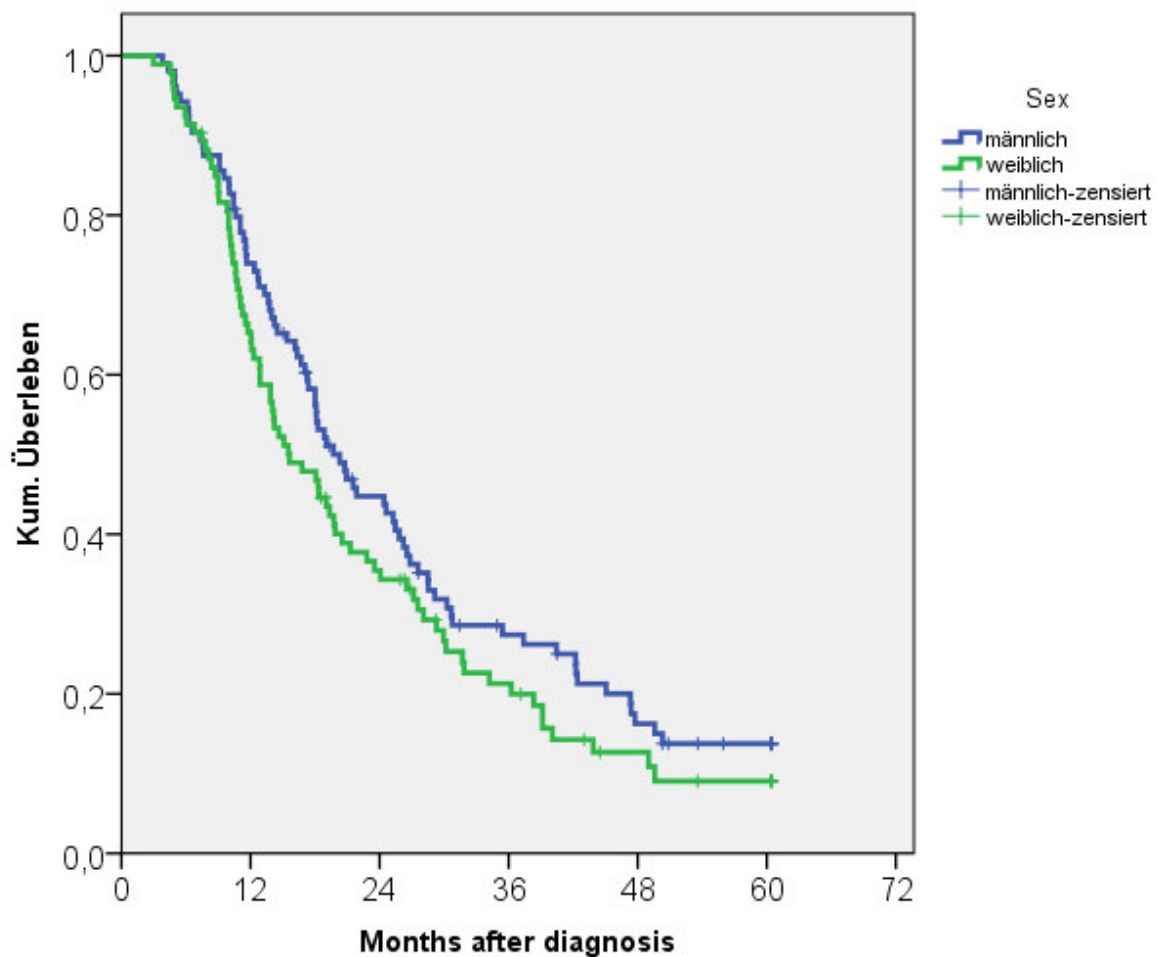


Abbildung 11: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zum Geschlecht, $p=0,149$

Tabelle 8: Einteilung in Altersgruppen

Alter in Jahren	Gesamtzahl	Mediane Überlebenszeit	<55 Jahre p	55-64 Jahre p	65-69 Jahre p
<55	38	27			
55-64	57	18	0,542		
65-69	52	18	0,032	0,124	
>70	50	14	0,081	0,136	0,865
Gesamt	197	18			

Einteilung der Altersklassen erfolgte in 4 Gruppen: <55, 55-64, 65-69 und >70 Jahre. Unter 55-jährige Patienten wiesen eine signifikant bessere Überlebenschance ($p=0,032$) auf gegenüber der Gruppe von 65-69 Jahren. Alle anderen Korrelationen ergaben keine Signifikanz.

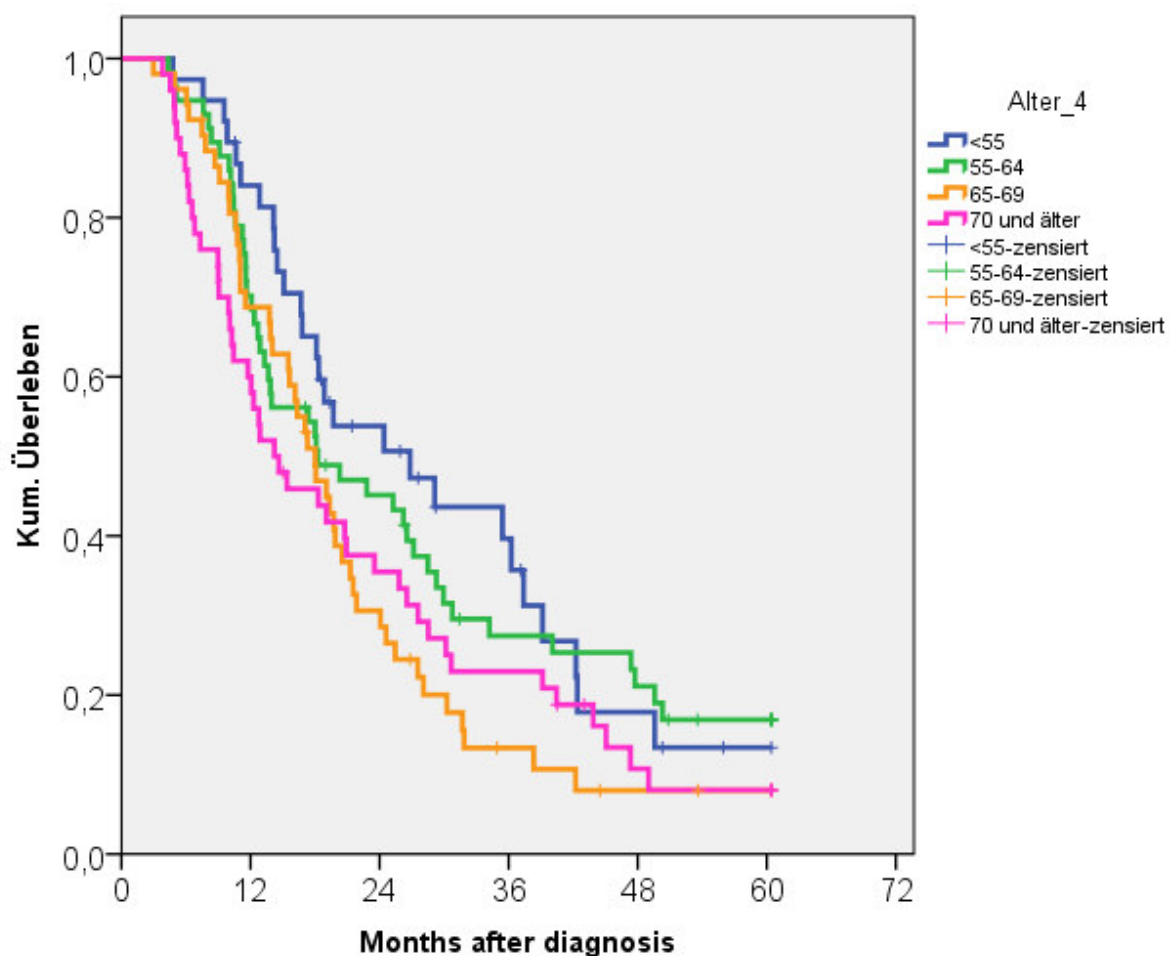


Abbildung 12: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zur Altersgruppe

4.4.2. Überleben in Abhängigkeit von TNM-Klassifikation und Graduierung

Bei der Graduierung wurden Grade 1/2 und 3/4 zusammengefasst. Von 195 Patienten wurden 105 in der high-Grade-Gruppe (Grad 3/4) eingeordnet und 90 in der low-Grade-Gruppe (Grad 1/2). Hierbei zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied von $p < 0,001$.

Tabelle 9: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit zum Grading

Graduierungs-Gruppe	Gesamtzahl
Low	90
High	105
Gesamt	195

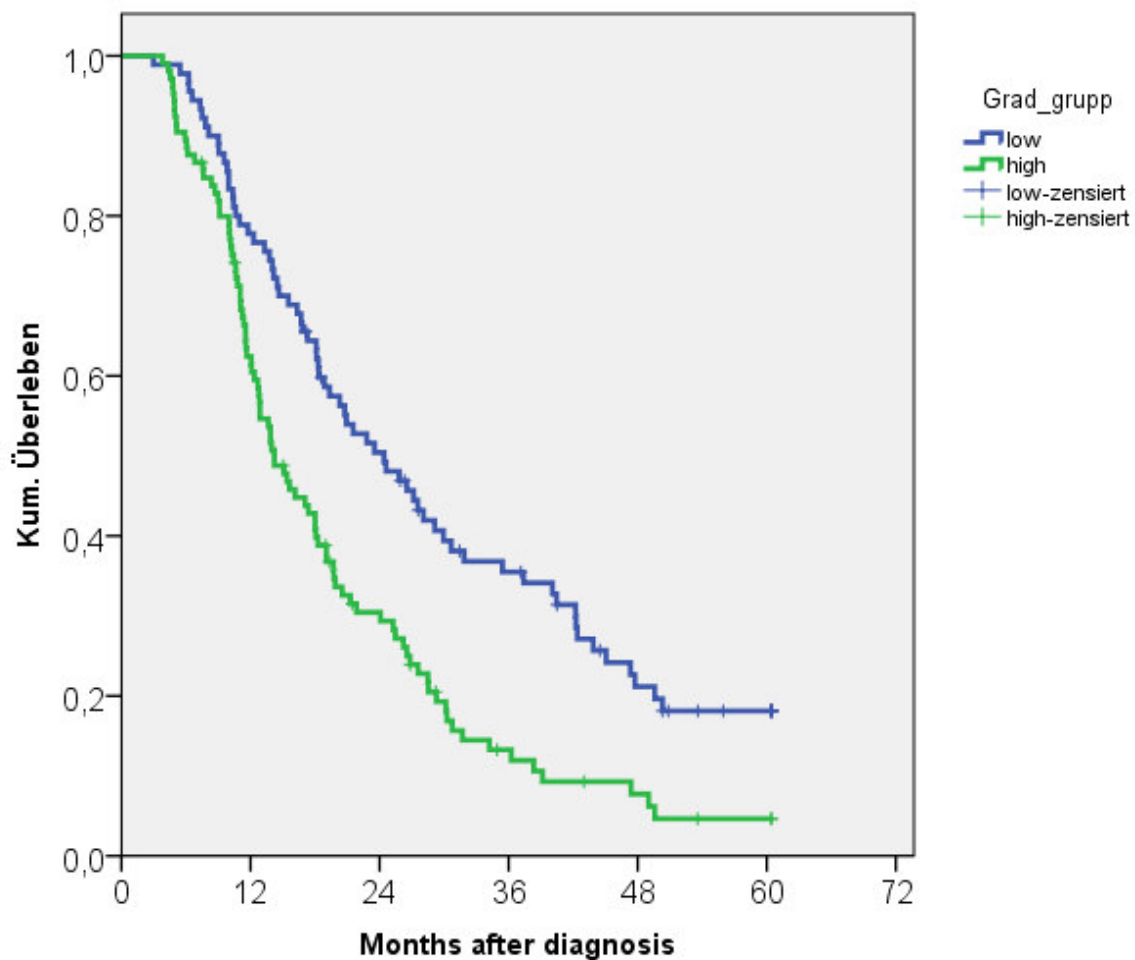


Abbildung 13: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zu low/high grade, $p < 0,001$

Beim Nodalstatus wiesen 66 Patienten keinen Lymphknotenbefall auf und 129 hatten einen positiven Befund. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz.

Tabelle 10: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit vom Nodalstatus

Nodalstatus	Gesamtzahl
pN0	66
pN1	129
Gesamt	195

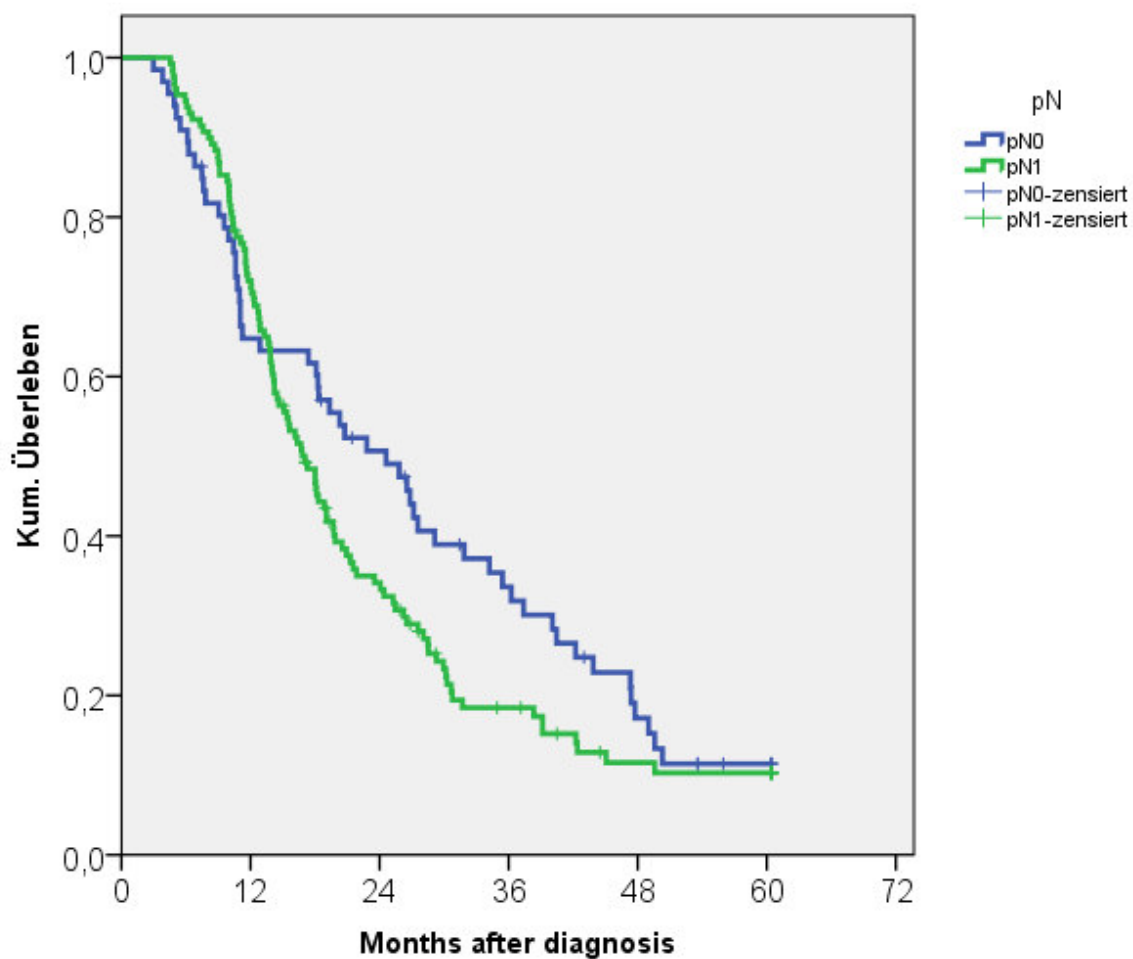


Abbildung 14: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zum Nodalstatus, $p=0,148$

Im Patientenpool befanden sich 17 Fälle im UICC-Stadium I. Stadium II und III wurden zu einer Gruppe zusammengefasst und beinhaltete 178 Fälle bei einer Gesamtzahl von 195 Fällen. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz.

Tabelle 11: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit vom UICC-Stadium

UICC-Stadium	Gesamtzahl
Stadium I	17
Stadium II/III	178
Gesamt	195

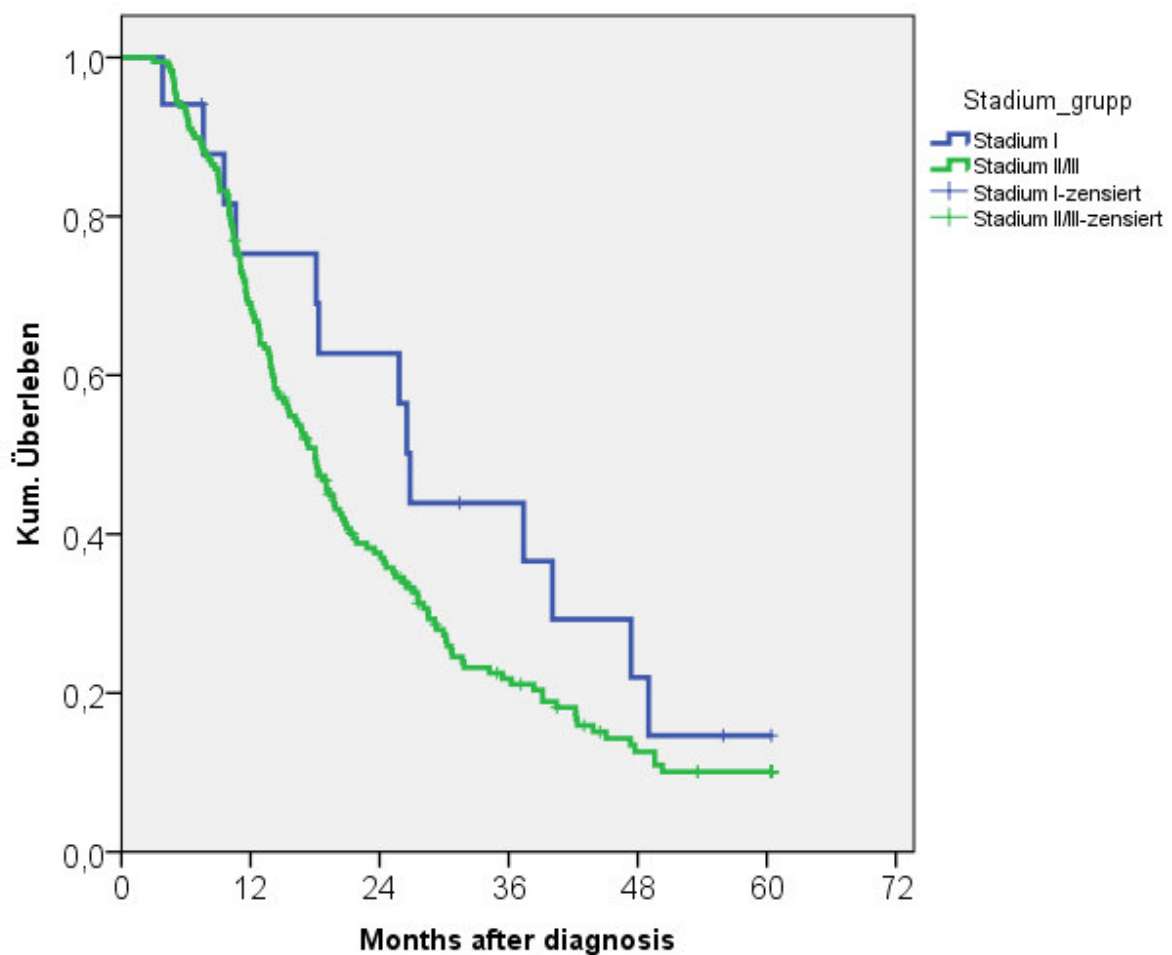


Abbildung 15: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zum Stadium, $p=0,204$

4.4.3. Überleben in Abhängigkeit von der Expression der Biomarker

4.4.3.1. Alle Patienten

Eine hohe Expression (Score 1/2/3) von p16 wurde einer negativen Expression (Score 0) gegenübergestellt. Bei einer Gesamtzahl 197 Fällen waren 138 (Score 0) nicht exprimiert und 59 (Score 1/2/3) exprimiert. Das Ergebnis des Vergleiches der Überlebenskurven mittels Log-Rank-Test wies keine statistische Signifikanz auf.

Tabelle 12: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit von der p16-Expression

p16	Gesamtzahl
negativ	138
positiv	59
Gesamt	197

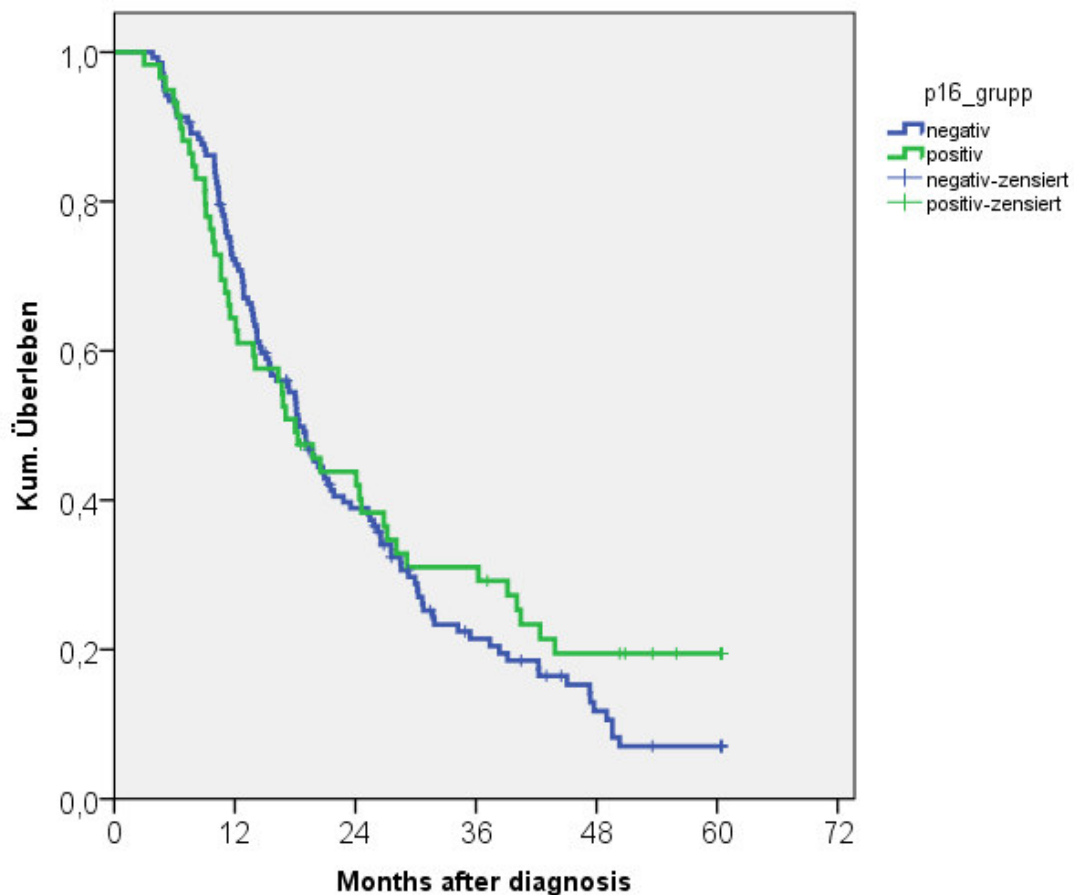


Abbildung 16: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zur Expression von p16,
 $p=0,377$

Bei der Einteilung der TNFRS-Expression wurden Score 0/1 und 2/3 zusammen gefasst. Bei einer Patientenzahl von 197 wurden 87 Fälle in der ersten und 110 Fälle in der 2. Gruppe zusammen gegliedert. Es zeigte sich keine statistische Signifikanz.

Tabelle 13: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit von der TNFRS-Expression

TNFRS	Gesamtzahl
0/1	87
2/3	110
Gesamt	197

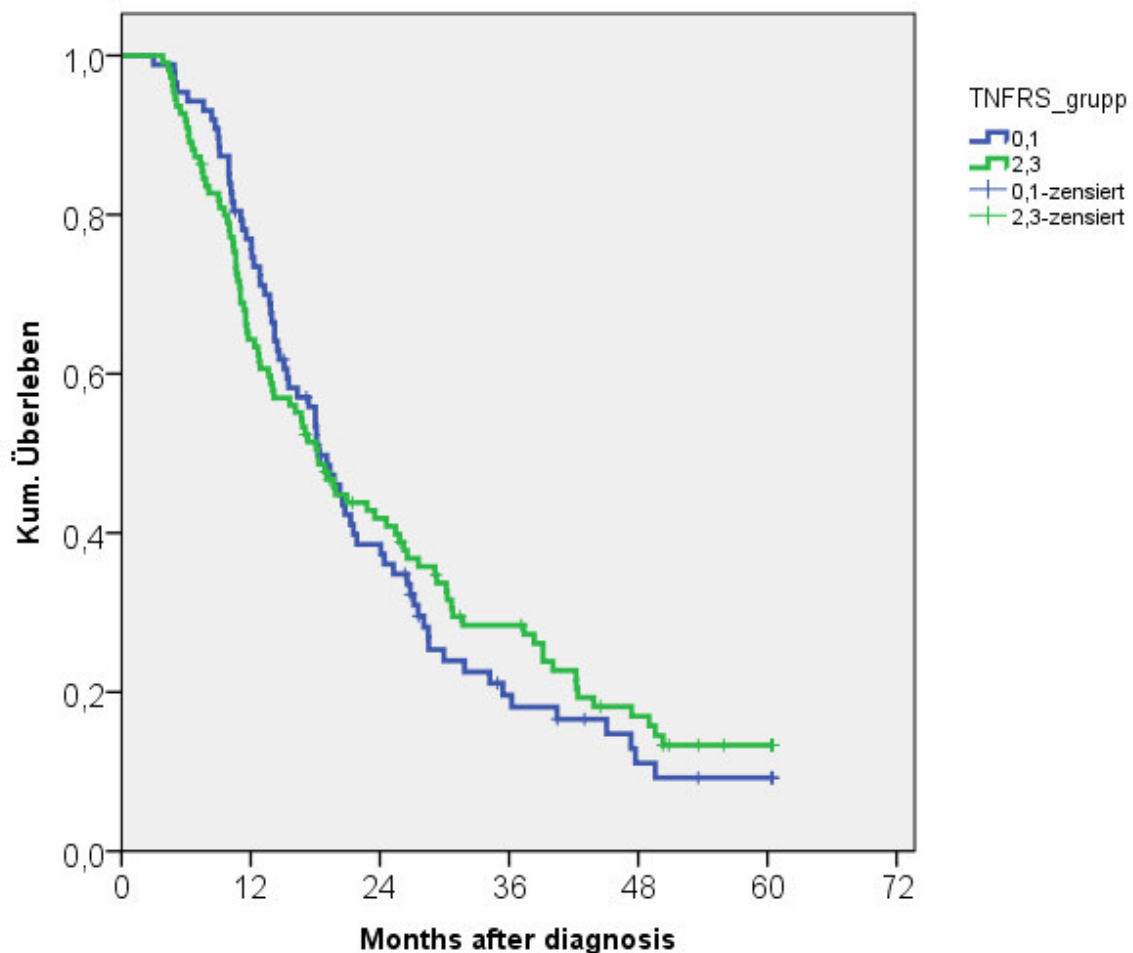


Abbildung 17: Überlebensfunktion in Abhängigkeit zur Expression von TNFRS,
p=0,154

Bei der Expression von ARTS wurden Score 0/1 und 2/3 zusammen gefasst. Hierbei gehörten von 197 Fällen n=106 zur Gruppe 1 und n=91 zur Gruppe 2. Das Ergebnis der Korrelation mit der Überlebensrate ergab keine Signifikanz.

Tabelle 14: Anzahl der Patienten in Abhängigkeit von der ARTS-Expression

ARTS	Gesamtzahl
0/1	106
2/3	91
Gesamt	197

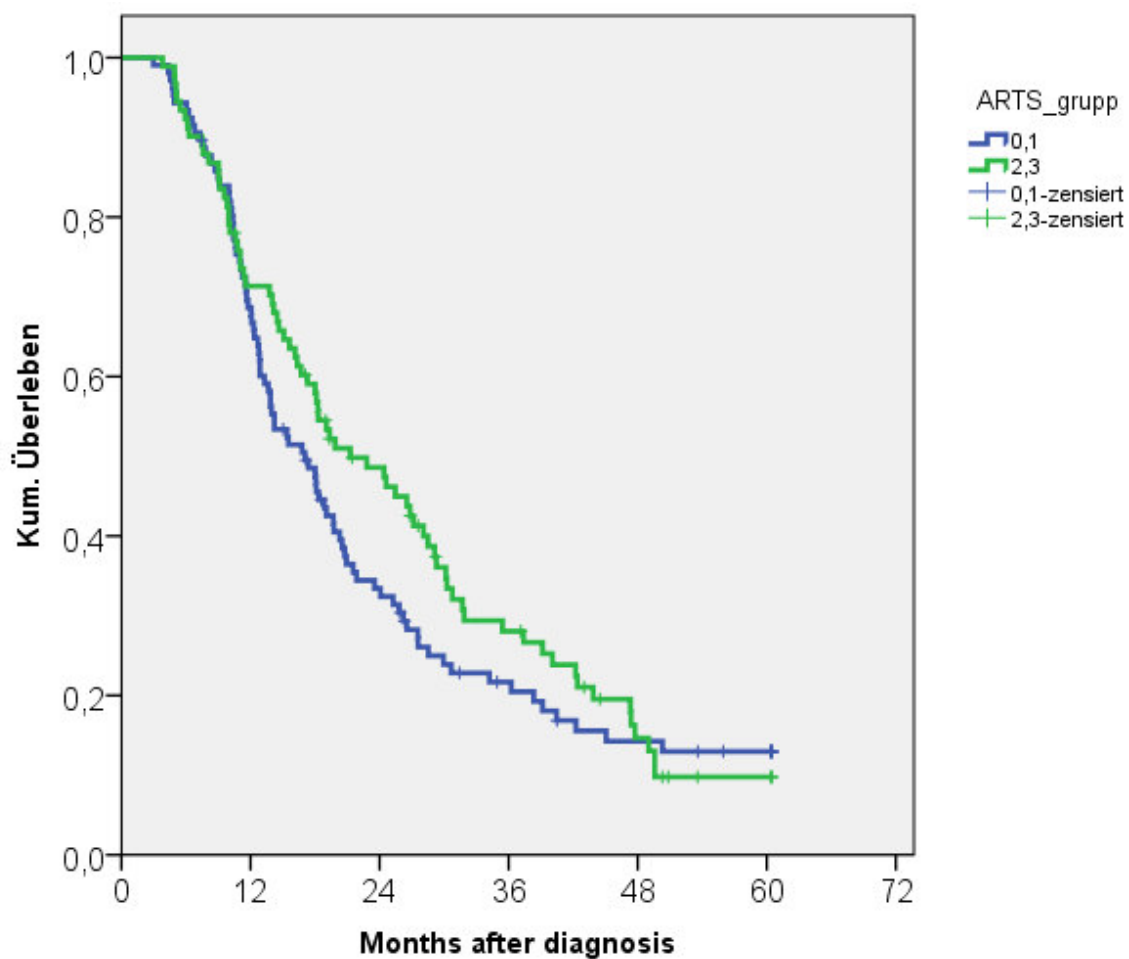


Abbildung 18: Überlebensfunktion in Abhängigkeit von der Expression von ARTS, $p=0,294$

4.4.3.2. Patienten mit minimaler Überlebenszeit (<12 Monate)

Bei der minimalen Überlebenszeit wurden alle Fälle mit einer Überlebenszeit unter 12 Monaten (n=146) mit der Expression der Biomarker korreliert. Eine hohe p16-Expression zeigte eine Tendenz zum besseren Überleben der Patienten ($p=0,067$).

Tabelle 15: Expression von p16 bei minimaler Überlebenszeit

p16	Gesamtzahl	p
negativ	105	0,067
positiv	41	
Gesamt	146	

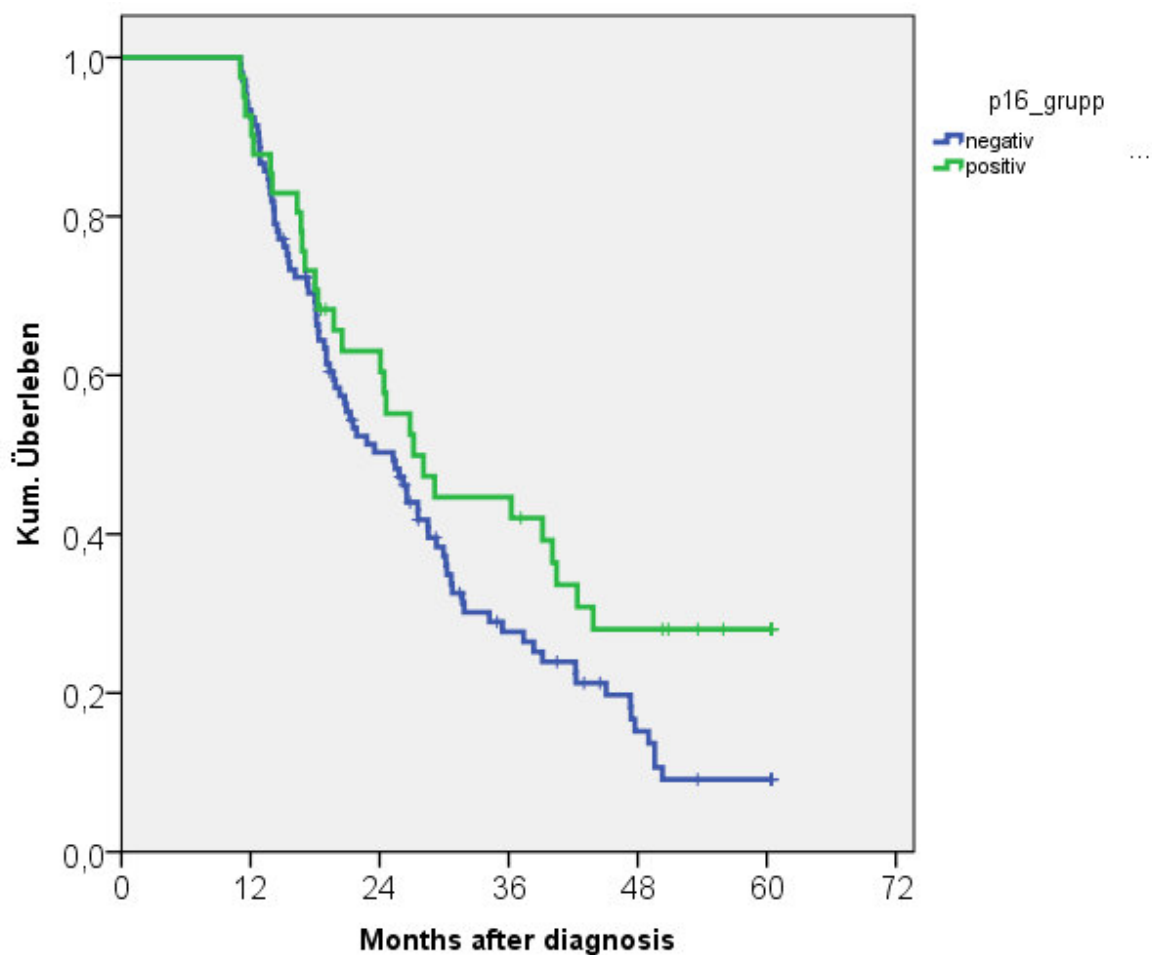


Abbildung 19: Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Expression von p16 bei minimaler Überlebenszeit, $p=0,67$

Bei der Korrelation der TNFRS-Expression mit minimaler Überlebenszeit (<12 Monate) wurden die schwache Färbung (Score 0/1) der starken (Score 2/3) gegenüber gestellt. Das Ergebnis wies keine Signifikanz auf.

Tabelle 16: Expression von TNFRS bei minimaler Überlebenszeit (<12 Monate)

TNFRS	Gesamtzahl	p
0/1	69	0,127
2/3	77	
Gesamt	146	

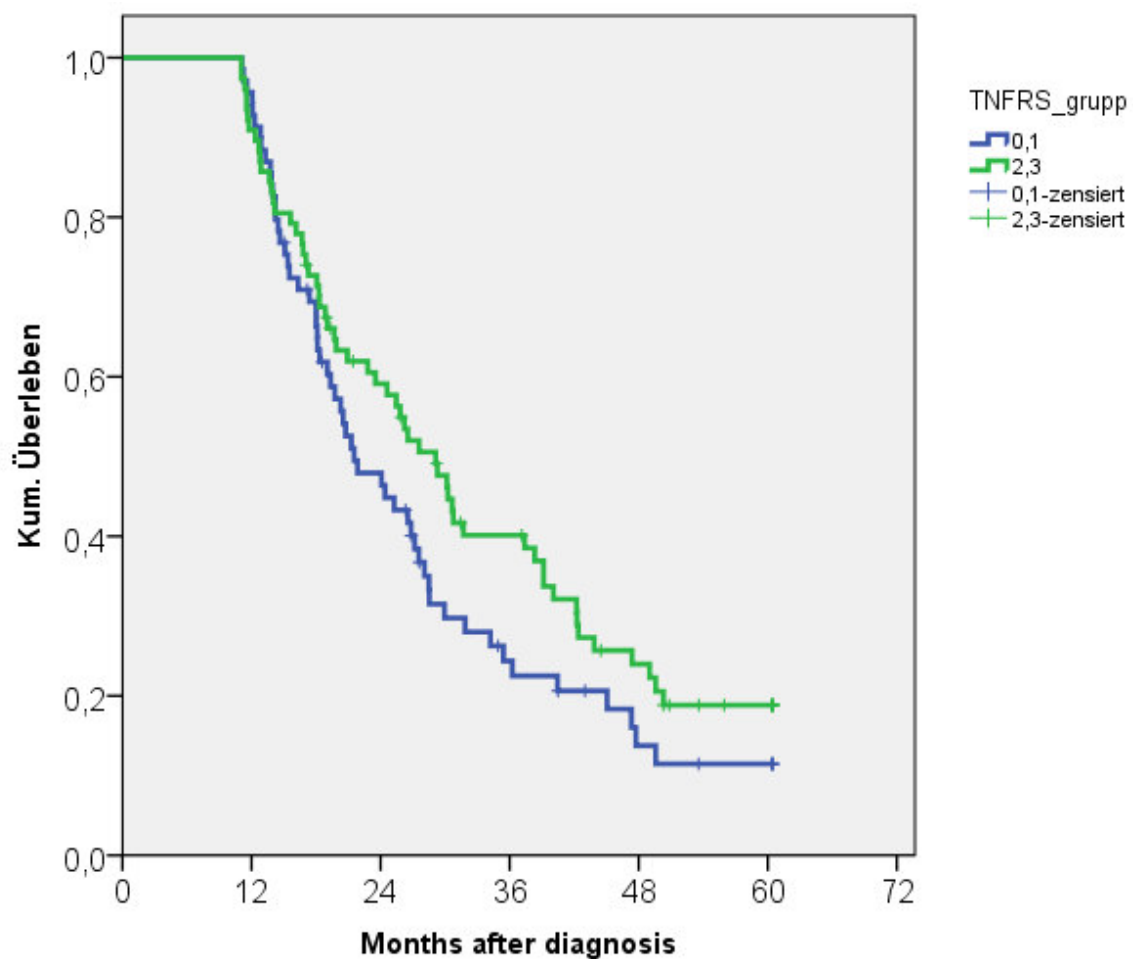


Abbildung 20: Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Expression von TNFRS bei minimaler Überlebenszeit, $p=0,127$

Bei der Korrelation der ARTS-Expression mit der minimalen Überlebenszeit (<12 Monaten) wurde die Score 0/1 und Score 2/3 zusammengefasst, um die schwache Expression mit der Starken zu vergleichen. Hierbei war keine Signifikanz ermittelbar.

Tabelle 17: Expression von ARTS bei minimaler Überlebenszeit (<12 Monate)

ARTS	Gesamtzahl	p
0/1	78	0,256
2/3	68	
Gesamt	146	

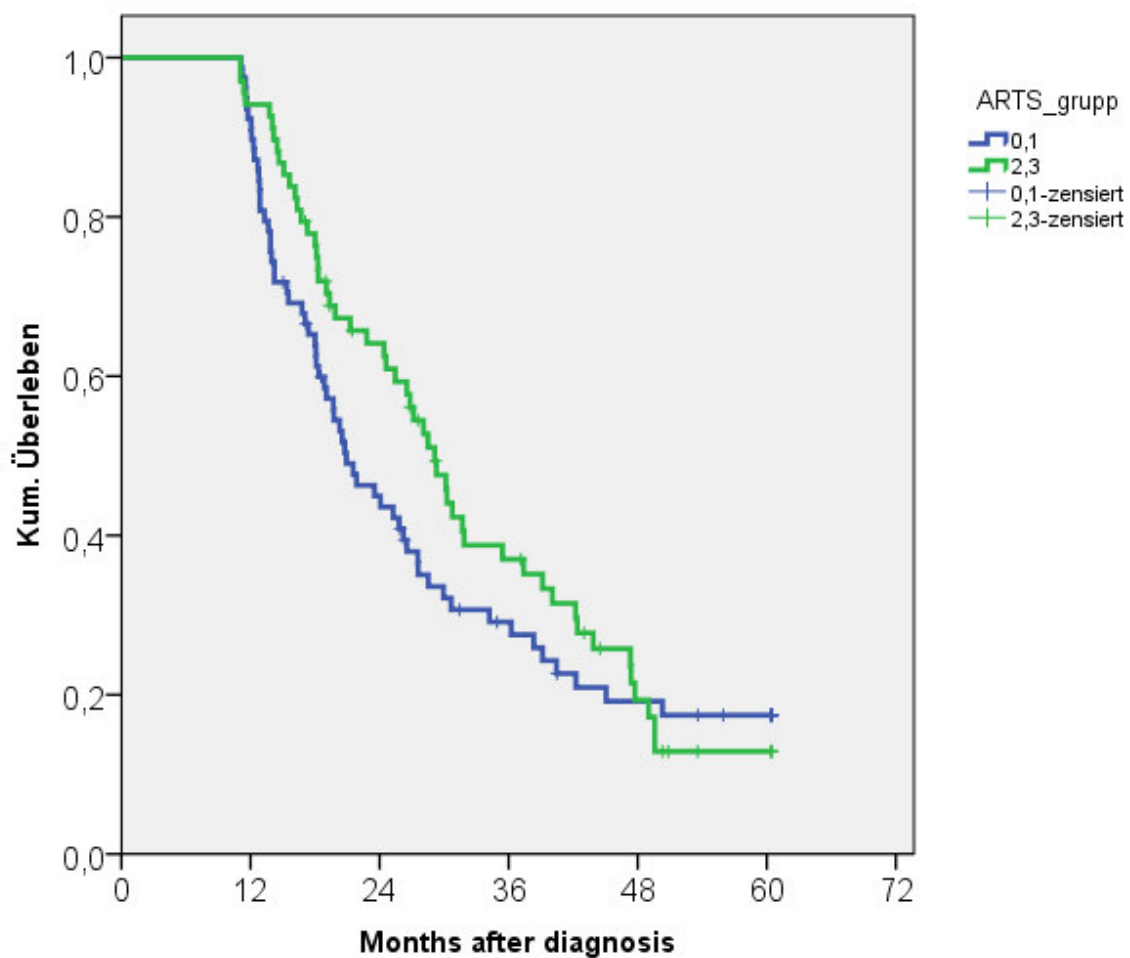


Abbildung 21: Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Expression von ARTS bei minimaler Überlebenszeit, $p=0,256$

4.4.3.3. Kombinationen der Biomarker

Bei der Kombination der Biomarker wurde der Zusammenhang der Expression der Biomarker untereinander mit der Kurzzeitüberlebensrate (<12 Monate) untersucht. Die Korrelation von p16 und TNFRS ergab bei der Kombination beide stark exprimiert gegen beide schwach exprimiert ($p=0,024$) und bei der Kombination beide stark exprimiert gegen nicht gleichsinniger Expression eine statistisch relevante Signifikanz ($p=0,004$).

Tabelle 18: Kombination der Biomarker p16 und TNFRS

p16 und TNFRS	Gesamtzahl	beide schwach	beide stark
beide schwach	53		
beide stark	25	$p=0,024$	
nicht gleichsinnig	68	$p=0,795$	$p=0,004$
Gesamt	146		

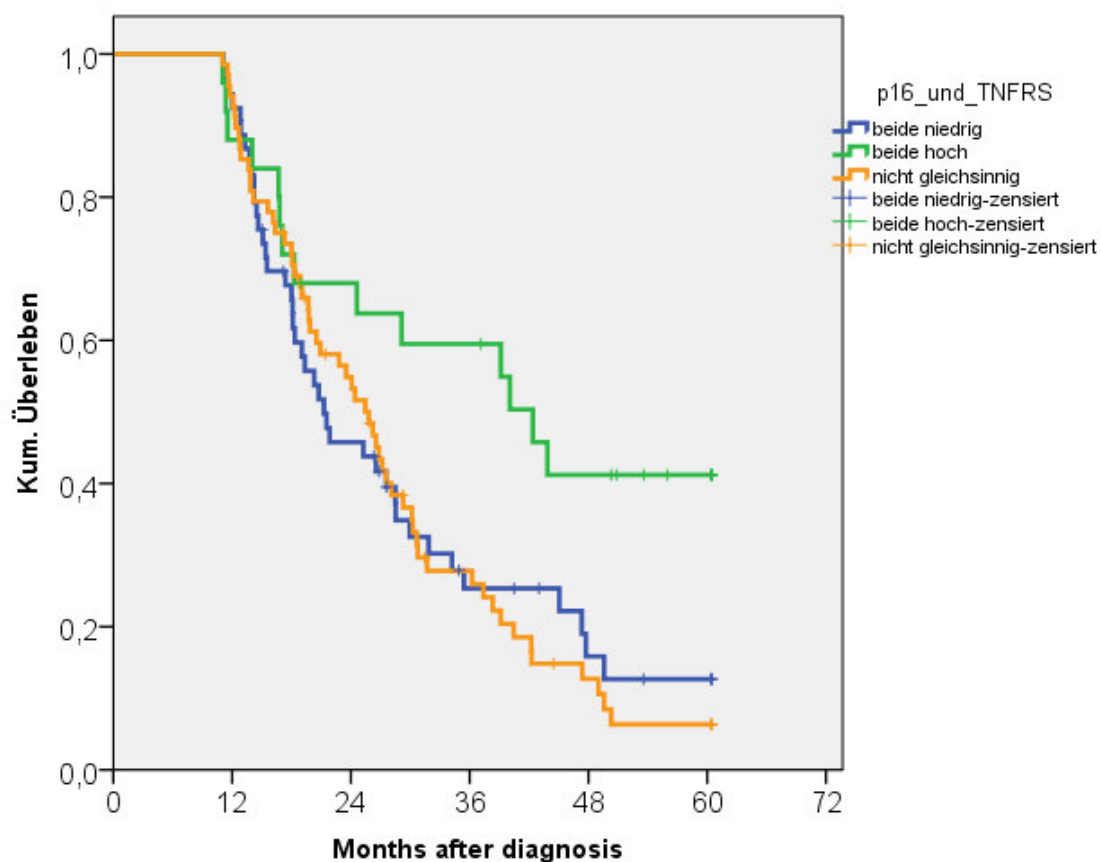


Abbildung 22: Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Kombination der Expression von TNFRS und p16

Die Korrelation der Biomarker p16 und ARTS ergab bei der Kombination beide schwach exprimiert gegen eins von beidem stark exprimiert eine statistisch relevante Signifikanz ($p=0,013$).

Tabelle 19: Kombination der Biomarker p16 und ARTS

p16 und ARTS	Gesamtzahl	p
beide schwach	59	
eins von beiden stark	87	0,013
Gesamt	146	

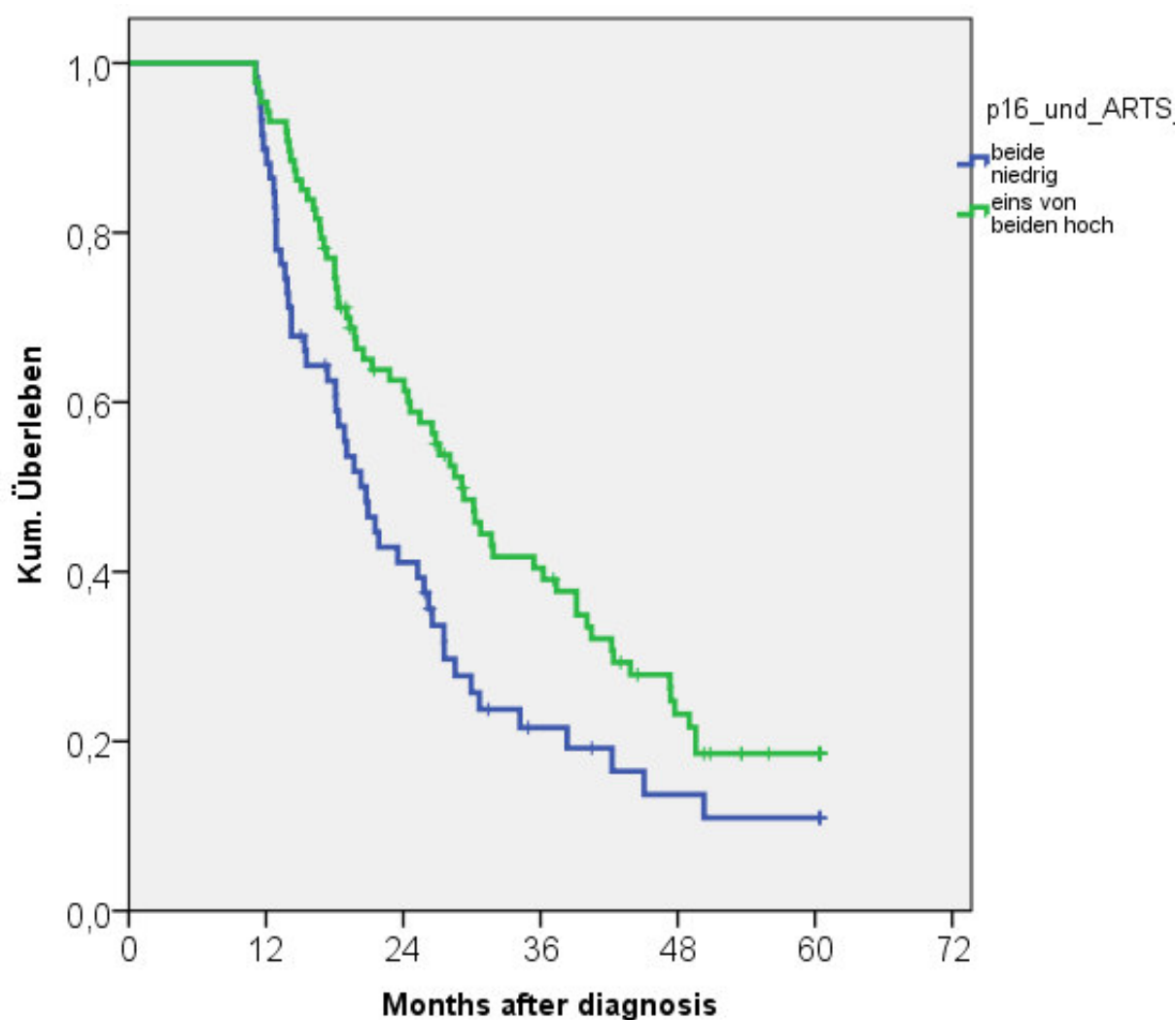


Abbildung 23: Überlebensfunktion in Abhängigkeit der Kombination der Expression von ARTS und p16, $p=0,013$

4.5. Multivariate Analyse

Die multivariate Analyse wurde mit Daten von 183 Patienten durchgeführt. Es wurde eine minimale Überlebenszeit von <12 Monaten als Limit gewählt. Alle Merkmale sind bekannt.

Tabelle 20: Übersicht aller Merkmale

pN	0=pN0	56
	1=pN1	127
Sex	1=männlich	101
	2=weiblich	82
Alter	1=<65 Jahre	93
	2=65 Jahre und älter	90
M	0=M0	174
	1=M1	9
R	0=R0/R1	175
	2=R2	8
pT	2=pT1/2	35
	3=pT3/4	148
p16_und_ARTS	1=beide niedrig	69
	3=eins von beiden hoch	114
Grad	2=low	84
	3=high	99

Durchgeführt wurde eine COX-Regression nach der Methode = vorwärts schrittweise.

Tabelle 21: Cox-Regression

	p	Exp(B)	95,0% Konfidenzinterv. für Exp(B)	
			Untere	Obere
Grade	,000	2,100	1,494	2,951
p16 und ARTS	,007	1,598	1,137	2,247

In der multivariaten Analyse stellte sich als der wichtigste unabhängige Faktor die Graduierung des Tumors dar ($p=0,000$). Als zweit wichtigster unabhängiger statistischer Faktor erwies sich die Korrelation von p16 und ARTS ($p=0,007$).

Keinen signifikanten Einfluss auf die Prognose hatten das Alter, die Herkunft, das Geschlecht, der Nodalstatus, Fernmetastasen, die Tumorgroße und der Residualstatus. Allen anderen eingesetzten Biomarkern konnte keinerlei Beeinflussung des Krankheitsverlaufes in der multivariaten Analyse nachgewiesen werden.

5. Diskussion

Die Entwicklung neuer therapeutischer Wirkstoffe und eine rechtzeitige Diagnosestellung sind beim PDAC auf Grund seiner außergewöhnlich niedrigen 5-Jahres-Überlebensrate wichtige Ziele der heutigen Tumorforschung. Daher haben wir es uns in dieser Arbeit zum Ziel gesetzt den Einfluss der klinikopathologischen Parameter und den Effekt der Expression der Biomarker p16, OPG (TNFRS) und ARTS auf das Lang- und Kurzzeitüberleben ($>/<12$ Monate) durch Kombination von Gewebe-Array-Verfahren (TMA) und Immunhistochemie zu untersuchen. Diese Verfahrenskombination erlaubt ein zügiges Auswerten und Graduieren der Gewebeprobe und besitzt somit ein hohes Maß an Standardisierung (Graham et al. 2008, Camp et al. 2008).

Unser großgewähltes Tumorkollektiv umfasste 297 Patienten, die aus den drei Unikliniken Regensburg, Jena und Dresden stammen. Die Tissue-Mikro-Array-Herstellung und die immunhistochemische Färbung erfolgten in den Unikliniken Jena und Dresden. Bei der Probenauswertung wurde eine histologische Graduierung mit Einteilung der Farbtintensität in einem vier-stufigem Score angewandt: keine Färbung (0), schwache Färbung (1), moderate (2) und starke (3) Färbung. Die Auswertung fand per Computer mit Hilfe des npd.view-Programmes von Hamamatsu Version 1.1 27 statt. Dafür wurden die TMAs mit Hilfe des Scanners „Nano Zoomer 2. OHT“ von Hamamatsu registriert und digitalisiert.

Zunächst haben wir die klinikopathologischen Daten betrachtet sowie die Expression der Biomarker untersucht. Anschließend führten wir eine univariate Analyse der klinikopathologischen Parameter und der einzelnen Biomarker im Zusammenhang mit der Überlebensrate durch. Desweiteren kombinierten wir die Biomarker mit dem Kurzzeitüberleben der Patienten (<12 Monate), um eventuelle statistisch relevante Korrelationen zu erkennen. Mithilfe der multivariaten Regressionsanalyse nach Cox wurden klinikopathologische sowie immunhistologische Faktoren gesucht, die einen unabhängigen statistisch signifikanten Einfluss auf das Überleben haben. Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe des „SPSS für Windows“ Software Version 19. Als statistisch signifikant wurden p-Werte $<0,05$ angesehen. Die Überlebenskurven wurden mittels Kaplan-Meier-Methode berechnet und mittels Log-Rank-Test verglichen. Für die multivariate Analyse wurde ein Cox-Regressionsmodell berechnet.

Die Gesamtzahl aller Patienten betrug nach Ausschluss fehlender Merkmale 292 Fälle. In unserem Kollektiv befanden sich 113 Patienten aus Jena, 71 aus Regensburg und 108 aus Dresden. Der Altersmedian lag in dieser Studie bei 65 Jahren und damit niedriger als im Vergleich: Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt in den USA bei 70 Jahren (Howlader et al. 2017). 53,4% der Patienten sind Männer, 46,6% sind weiblich. Bei der Altersverteilung waren 45,2% Patienten in unserem Kollektiv jünger als 65 und 54,8% 65 Jahre alt oder älter. Bis zum Zeitpunkt der Datenerhebung betrug die Sterberate 87,3%. Beim histologischen Grading befanden sich die meisten Patienten im Stadium 2 (n=115) oder 3 (n=157). Nur 19 Patienten wiesen zur Zeit der Diagnose bereits Fernmetastasen auf, dafür hatten bereits 67,8% einen Lymphknotenbefall (n=198). Die Tumorgröße war in 80,8% der Fälle schon im T3-(n=228) oder T4-(n=8) Stadium. Bei 76% Patienten war postoperativ kein mikroskopischer Rest des PDACs vorhanden (R0=222).

Bei der Überlebenszeitanalyse wurden alle Fälle mit einem postoperativen Überleben von weniger als 90 Tage ausgeschlossen, weil dieses als perioperatives Versterben gewertet wurde. Daher umfasste diese Gruppe noch 197 Patienten. Die 5-Jahres-Überlebensrate betrug in unserer Studie $8 \pm 2\%$, welches sich mit der 5-Jahres-Überlebensrate von 8,2% aus der Studie von Howlader et al. aus 2017 deckt. Die mediane Überlebenszeit betrug 15 Monate.

Bei der univariaten Analyse der klinikopathologischen Parameter und deren Einfluss auf die Überlebensrate der Patienten stellten wir fest, dass weder Geschlecht, Herkunft, pTNM-Klassifikation noch das UICC-Stadium einen prognostischen Einfluss auf das Langzeitüberleben hatten. Nur eine höhere Graduierung (G1/2 vs. G3) wies eine signifikante Korrelation mit einem kürzeren Überleben der Patienten ($p < 0,01$) auf. Rochefort et al. haben in ihrer Studie ebenfalls das histologische Grading als einzigen signifikanten Faktor ($p < 0,001$) konstatieren können (Rochefort et al. 2014). Bei der Altersverteilung lebte die Gruppe der unter 55-jährigen Patienten im Vergleich mit den Patienten über 65 Jahre statistisch signifikant länger ($p = 0,032$). Die aktuelle Datenlage bestätigt eine bessere mediane Überlebenszeit bei jüngeren Patienten (Raju et al. 2015). In einigen Publikationen wurde eine gering schlechtere Überlebenschance bei Männern gegenüber dem weiblichen Geschlecht festgestellt (Ferrone et al. 2005, Yadav et al. 2013, Howlader et al. 2017), jedoch gibt es auch Quellen die dies so wie wir auch in dieser Arbeit nicht bestätigen können (Moghanaki et al. 2011).

Die Relevanz der verschiedenen pathologischen Parameter wird in der Literatur sehr kontrovers diskutiert: Bei Moghanaki et al. wiesen die Parameter Alter, Resektionsrand und positiver Lymphknotenstatus die größte statistische Signifikanz auf (Moghanaki et al. 2011), Bogoevski et al. haben dem Grading, Stadium und Resektionsrand die prognostisch relevanteste Aussagekraft beigemessen (Bogoevski et al. 2008). In ihrer Studie fanden wiederum Stark et al. heraus, dass beim Langzeitüberleben ein niedriges Grading mit einer besseren Langzeitprognose assoziiert ist (Stark et al. 2016). Diese ungenaue Datenlage der vielen verschiedenen Studien macht eine genauere Gewichtung der klinikopathologischen Parameter unmöglich und verhindert somit eine verlässliche Prognosestellung für den Patienten. Nach wie vor benötigt man daher dringend prädiktive frühdiagnostische Biomarker und eine zielgerichtete Therapie, die die schlechten Überlebensraten des duktales Adenokarzinomes des Pankreas signifikant verbessern.

Daher überprüften wir die Expression der Biomarker p16, ARTS und TNFRS (OPG) auf Proteinebene und korrelierten dies mit der Überlebensrate unserer Patienten. Bei der Probenanalyse des Biomarkers p16^{INK4} wurden aufgrund der hohen Anzahl ungefärbter Proben die negativen Färbungen den Positiven in Abhängigkeit zur Überlebensrate (Score 0 gegen 1/2/3) gegenüber gestellt. Bei einer Gesamtanzahl von 197 Fällen waren 138 nicht angefärbt, 59 hatten eine positive Färbung. Dies bedeutet, dass eine negative Expression von p16^{INK4} bei 70% aller Patienten vorlag. In der Literatur wurde in den vielen existierenden Studien sehr unterschiedliche starke Expression von p16^{INK4} festgestellt. Xiang et al hatten ein Ergebnis in ihrer Studie von 142 Fällen mit positiver (59%) und 99 (41%) mit negativer Expression (Xiang et al. 2016). Bei Ohtsubo et al. wiesen nur 23% der PDAC-Gewebeproben keine Färbung auf (Ohtsubo et al. 2003). Hustinx et al. haben einen Prozentsatz von 90%igem Funktionsverlust im invasiven Pankreaskarzinom erhalten (Hustinx et al. 2005). Obwohl der Expressionsverlust von p16^{INK4} in der Literatur zwischen 30% bis über 90% liegt, weisen die meisten Studien Ergebnisse zwischen 80-90% auf (Singh et al. 2011). Unser Wert lag mit circa 70%-iger Expression knapp darunter. Das Tumorsuppressorprotein p16^{INK4} fungiert im Zellzyklus als Kontrollmechanismus am G1/S-Phasenpunkt. Dessen Expressionsverlust spielt eine Schlüsselrolle in der Kanzerogenese des PDAC am Übergang der Vorläuferläsionen PanIn 1 zu 2 (Kanda et al. 2012, Oshima et al. 2013).

In unserer Studie konnten wir nachweisen, dass eine Negativität der p16^{INK4}-Expression (Score=0) mit einem Trend ($p=0,067$) zum schlechteren Überleben der Patienten beim Kurzzeitüberleben (<12 Monaten) beitrug, jedoch hat sich dies nicht für das Langzeitüberleben der Patienten bestätigt. Jeong et al. kamen hingegen zu dem Ergebnis, dass keine Signifikanz zwischen dem Überleben und Mutation von p16 besteht (Jeong et. al 2005). Bei Xiang et al lag die mittlere Überlebenszeit mit positiver Expression bei 18 Monaten, bei negativer bei 16,5 Monaten, die statistische Signifikanz betrug somit $p=0,019$ (Xiang et. al 2016). Auch in weiteren Forschungen wurde eine eindeutig statistisch signifikante Korrelation ($p<0,001$) zwischen dem besserem Überleben und einer positiven p16^{INK4}-Expression festgestellt (Gerdes et al. 2002, Ohtsubo et al. 2003).

Der zweite von uns untersuchte Biomarker war Osteoprotegerin (TNFRS), ein Mitglied der Tumor-Nekrosen-Rezeptor-Superfamilie. 98,3% der TMAs haben TNFRS exprimiert. Beim der Immunhistologischen Auswertung teilten wir in einen niedrigen Score (Score 0+1) und einen hohen Score (Score 2+3) ein. Bei einer Patientenzahl von 197 wurden somit 87 Fälle in der ersten und 110 Fälle in der 2. Gruppe zusammen gefasst. Unsere Studie ergab keine statistische Signifikanz zu einem besseren Überleben. Osteoprotegerin besitzt als Mitglied der TNFRS-Familie mehrere Aufgaben im menschlichen System vor allem jedoch in der Knochenhomöostase im Zusammenhang mit dem RANK/RANKL/OPG-System und in der Inhibierung des proapoptotische TRAIL (Cody et al. 2012). In vielen Studien wurde ein pathologisch verändertes RANKL/OPG-Verhältnis in Tumorarten mit einer hohen Knochenmetastasierungsrate z.B. bei Brust- und Prostatakrebs nachgewiesen und als möglicher Therapieansatz erforscht (Ney et al. 2013, Cody et al. 2012, Rafiei et Komarova 2013, Armstrong et al. 2008). Aber ein erhöhter OPG-Spiegel wurde nicht nur in Karzinomen mit Knochenmetastasen, auch andere Tumore wie maligne Kolon- und Eierstocktumore weisen eine erhöhte Expression auf. In einer in-vitro Studie von Satoh et al. wurde festgestellt, dass 60% aller im Stadium 4 befindlichen PDAC Osteoprotegerin exprimiert haben, während die gesunden Zellen keine erhöhte Rate aufwiesen (Satoh et. al 2001). Auch andere Studien wiesen eine erhöhte OPG-Expression im PDAC nach (Sahu et al. 2011, Yuan et al. 2013). Lipton et al. haben in ihrer Studie festgestellt, dass PDAC-Patienten einen erhöhten OPG-Serumwert besitzen (Lipton et. al 2002).

Die Erklärung liegt möglicher Weise in der 2. Funktion von OPG: die Inhibition von TRAIL und somit der Verhinderung der extrinsischen Apoptose (Emerey et al. 1998). Kanzaki et al. untersuchten in ihrer experimentellen Studie die von ihnen aufgestellte These, dass PDAC-Zellen, die ein mutiertes K-ras besitzen, durch endogene Expression von OPG resistent gegen TRAIL werden (Kanzaki et al. 2012). Ihre Ergebnisse bestätigten dies: eine Verminderung des OPG-Serumspiegels resultiert in einem besseren Ergebnis der TRAIL-basierten Therapie. In einer Studie mit 333 untersuchten Patienten konnte man desweiteren durch Kombination der CA 19-9-, ICAM-1- und OPG-Antikörper mit einer Spezifität und Sensitivität von 88-90% die erkrankten von den gesunden PDAC-Zellen unterscheiden (Brand et al. 2011). Nolen et al. haben hingegen in ihrer Studie 76 Biomarker im Zusammenhang mit dem PDAC untersucht und haben nicht feststellen können, dass OPG als prädiktiver Marker verwendbar ist (Nolen et al. 2015). Die Rolle von OPG in der Tumorentstehung des PDACs bleibt bis heute nicht geklärt (Kanzaki et al. 2013). Auch die Bedeutung der signifikant erhöhten OPG-Blutserumwerte bei Pankreaskarzinompatienten ist noch unerforscht (Lipton et al. 2002, Brand et al. 2011). Eine genauere Datenlage, ob ein Zusammenhang zwischen der OPG-Expression und der Überlebensrate der Patienten besteht, fehlt. In unserer Studie erwies sich dies als nicht statistisch signifikant weder auf das Langzeit- noch auf das Kurzzeitüberleben der Patienten. Zur Sicherstellung sind weitere Forschungen vor allem auch in-vivo notwendig (Zauli et al. 2008, Lane et al. 2013).

Der dritte von uns untersuchte Biomarker war ARTS (Apoptosis-related-protein in the TGF-beta signaling pathway), ein proapoptotischer IAP-Antagonist (Gottfried et al. 2004). 93,2 % der 197 Fälle haben ARTS exprimiert (Score>0), das bedeutet einen Funktionsverlust bei 6,8% der Patientenfälle. Bei der Bioexpression von ARTS wurden Score 0/1 und 2/3 zusammen gefasst. Hierbei gehörten von 197 Fällen 106 zur Gruppe 1 und 91 zur Gruppe 2. In unserer Studie konnten wir keine signifikant erhöhte oder verminderte Überlebenschance durch verstärkte Expression von ARTS feststellen. In der Literatur gibt es bisher sehr viele Studien, die sich mit der Physiologie von ARTS und dessen Bedeutung in der Apoptose beschäftigen, jedoch wenige, die sich mit seiner Funktion als möglicher Tumormarker auseinandersetzen. Lee et al. untersuchten in ihrer Studie den Zusammenhang von P-Loop-Mutationen im ARTS-Gen in Magen-, Lungen- und Leberkarzinomen, konnten jedoch bei keinem der drei Tumore eine Signifikanz feststellen (Lee et al. 2014).

Elhasid et al. haben die Häufigkeit von Mutationen im Sept4-Gen in akuten lymphatischen Leukämien (ALL) betrachtet (Elhasid et. al 2004). Dabei stellte sich heraus, dass bei über 70% der ALL-Patienten ein völliger Funktionsverlust von ARTS vorlag. In einer anderen Studie über Astrozytome war die Expression von ARTS negativ korreliert mit der Überlebensdauer der Patienten, wobei in normalen Astrozyten dabei kein ARTS nachweisbar war, sondern der Expressionsgrad von ARTS mit dem Grad der Malignität anstieg (Gottfried et al. 2004). Garcia Fernandez et al. griffen die Idee der besseren Überlebenschance durch ARTS auf und untersuchten, ob bei Mäusen mit einer Genmutation im Sept4-Locus eine höhere Wahrscheinlichkeit der Tumorentstehung vorliegt (Garcia-Fernandes et. al 2011). Sie bewiesen durch ihre Ergebnisse, dass ARTS sowohl ein proapoptotisches Protein als auch ein Tumorsuppressor ist. In unseren Ergebnissen konnten wir allerdings keinen Zusammenhang zwischen verminderter Expression von ARTS und der Überlebenschance der PDAC-Patienten feststellen.

Wir verglichen auch die Biomarker miteinander bei den Patienten mit einer Kurzzeitüberlebensrate unter 12 Monaten. Die Korrelation von p16 und ARTS ergab, dass Patienten mit einem niedrigen Score der beiden Biomarker (0 oder 1) eine bessere Überlebenschance mit einer Signifikanz von $p=0,013$ besitzen. Da ARTS ein proapoptotisches Protein ist und p16 als Tumorsuppressor den G1/S-Kontrollpunkt im Zellzyklus reguliert, entspricht dieses Ergebnis den Erwartungen. p16 und TNFRS zeigten eine statistisch signifikant bessere Überlebenschance, wenn einer der beiden Tumormarker stark exprimiert ist (Score 2/3, $p=0,004$ bzw. $0,024$).

Mithilfe der Multivarianten Analyse nach dem COX-Regression-Modell wurde überprüft, welche Variablen die Überlebenswahrscheinlichkeit des Patientenkollektivs beeinflussen. Dabei korrelieren 2 klinikopathologische Parameter das histologische Grading und die Kombination der Biomarker p16 und ARTS unabhängig mit dem kürzeren Überleben der Patienten. Die multivariaten Analysen anderer Studien ergaben, dass verschiedene klinikopathologischen Faktoren statistisch unabhängig signifikant sind: Jiang et al. stellten 2015 das Alter, der Lymphnotenstatus und das Grading als prognostische Faktoren fest, hingegen erwies sich in der Cox-Regression einer anderen Studie nur das Alter ($p=0,015$) als statistisch signifikant (Jiang et. al 2015, Geng et al. 2015). Es sind jedoch weitere klinische Studien nötig, um den genauen Zusammenhang festzustellen

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es die Expression der Biomarker p16, ARTS und TNFRS (OPG) im duktaalen Adenokarzinom des Pankreas auf Proteinebene zu überprüfen und in Zusammenhang mit den klinikopathologischen Daten und insbesondere mit dem Kurz- und Langzeitüberleben der Patienten (</> 12 Monate) zu stellen.

Das Tumorkollektiv von 297 Patienten aus Jena, Dresden und Regensburg wurde mittels Gewebe-Mikroarray und Immunhistochemie untersucht. Die Tissue-Mikro-Array-Herstellung und das immunhistochemische Färben erfolgten in den Unikliniken Jena und Dresden. Die Graduierung fand in einem vier-stufigem Score (keine Färbung (0), schwache Färbung (1), moderate (2) und starke (3) Färbung) statt. Anschließend wurde bei TNFRS und ARTS in low grade (0/1) und high grade (2/3) eingeteilt. Bei p16 wurde die Proben mit negativer Färbung (Score 0) der Gruppe mit Expression (Score 1/2/3) gegenüber gestellt. Für die univariate Analyse wurden die Überlebenskurven durch die Kaplan-Meier-Methode berechnet und mittels log Rank Test verglichen. Für die multivariate Analyse wurde ein Cox-Regressionsmodell berechnet.

Eine Negativität von p16 (Score=0) zeigte einen Trend zu einem schlechteren Überleben der Patienten (Kurzzeitüberleben <12 Monate, $p=0,067$). ARTS und TNFRS (OPG) hatten keinen statistisch signifikanten Einfluss auf das Kurz- oder Langzeitüberleben. Die Korrelation der Biomarker untereinander im Zusammenhang mit der Kurzzeitüberlebensrate ergab folgende Ergebnisse: Die Korrelation von p16 und ARTS ergab, dass Patienten mit einem niedrigen Score (0 oder 1) eine bessere Überlebenschance ($p=0,013$) besitzen. Die Korrelation p16 und TNFRS ergab ein statistisch signifikante verbesserte Überlebensrate ($p=0,004$ bzw. $p=0,024$), wenn einer der beiden Tumorsuppressor stark (Score 2/3) exprimiert wird.

Bei der multivariaten Analyse nach dem COX-Regression-Modell erwiesen sich vor allem 2 klinikopathologische Parameter als relevant: das histologische Grading und die Kombination der Biomarker p16 und ARTS.

Bei den klinikopathologischen Daten zeigte eine höhere Graduierung (G1/2 versus G3) eine signifikante Korrelation mit einem kürzen Überleben der Patienten beim Langzeitüberleben ($p<0,01$). Außerdem zeigte die Altersgruppe der < 55 Jährigen gegenüber der 65-69 Jährigen eine statistisch signifikant bessere Überlebenschance ($p=0,032$). Alle anderen Parameter waren nicht statistisch signifikant.

In unserem Kollektiv befanden sich 113 Patienten aus Jena, 71 aus Regensburg und 108 aus Dresden. Das mittlere Erkrankungsalter betrug 65 Jahre. Unser Patientenpool wies eine 5-Jahres-Überlebensrate von $8 \pm 2\%$ auf, die mediane Überlebenszeit betrug 15 Monate. 53,4% der Patienten sind Männer, 46,6% sind weiblich. Bei der Graduierung befanden sich die meisten Patienten in der Gruppe G2 (n=115) oder G3 (n=157). Nur 19 Patienten wiesen zur Zeit der Diagnose bereits Fernmetastasen auf, dafür hatten bereits 67,8% einen Lymphknotenbefall (n=198). Die Tumorgroße war in 80,8% der Fälle schon im T3- (n=228) oder T4- (n=8) Stadium. Bei 76% Patienten war postoperativ kein mikroskopischer Rest des PDACs nachweisbar (R0=222).

Eine negative Expressivität von p16 zeigte einen Trend zu einem kürzeren Überleben der Patienten beim Kurzzeitüberleben (<12 Monaten, $p=0,067$). p16-negative Tumoren kennzeichnen eine Subgruppe von duktalem Pankreaskarzinomen mit einer höheren Aggressivität. Eine Negativität von p16 kann daher als negativer prognostischer Tumormarker angesehen werden. Desweiteren könnte zukünftig die Kombination von ARTS und p16 oder ARTS und p16 als prognostischer Marker angewandt werden, jedoch sind hier noch weitere Studien zur Ermittlung des genaueren Zusammenhanges nötig.

7. Literaturverzeichnis

- Armstrong, A. P., R. E. Miller, J. C. Jones, J. Zhang, E. T. Keller, and W. C. Dougall. "Rankl Acts Directly on Rank-Expressing Prostate Tumor Cells and Mediates Migration and Expression of Tumor Metastasis Genes." [In eng]. *Prostate* 68, no. 1 (Jan 1 2008): 92-104.
- Attri, J., R. Srinivasan, S. Majumdar, B. D. Radotra, and J. Wig. "Alterations of Tumor Suppressor Gene P16^{ink4a} in Pancreatic Ductal Carcinoma." [In eng]. *BMC Gastroenterol* 5 (2005): 22.
- Biankin, A. V., J. G. Kench, F. P. Dijkman, S. A. Biankin, and S. M. Henshall. "Molecular Pathogenesis of Precursor Lesions of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." [In eng]. *Pathology* 35, no. 1 (Feb 2003): 14-24.
- Biankin, A. V., N. Waddell, K. S. Kassahn, M. C. Gingras, L. B. Muthuswamy, A. L. Johns, D. K. Miller, *et al.* "Pancreatic Cancer Genomes Reveal Aberrations in Axon Guidance Pathway Genes." [In eng]. *Nature* 491, no. 7424 (Nov 15 2012): 399-405.
- Bogoevski, D., T. Strate, E. F. Yekebas, and J. R. Izbicki. "Pancreatic Cancer: A Generalized Disease--Prognostic Impact of Cancer Cell Dissemination." [In eng]. *Langenbecks Arch Surg* 393, no. 6 (Nov 2008): 911-7.
- Borad, M. J., H. Saadati, A. Lakshmipathy, E. Campbell, P. Hopper, G. Jameson, D. D. Von Hoff, and M. W. Saif. "Skeletal Metastases in Pancreatic Cancer: A Retrospective Study and Review of the Literature." [In eng]. *Yale J Biol Med* 82, no. 1 (Mar 2009): 1-6.
- Bornstein, B., N. Edison, Y. Gottfried, T. Lev, A. Shekhtman, H. Gonen, K. Rajalingam, and S. Larisch. "X-Linked Inhibitor of Apoptosis Protein Promotes the Degradation of Its Antagonist, the Pro-Apoptotic Arts Protein." [In eng]. *Int J Biochem Cell Biol* 44, no. 3 (Mar 2012): 489-95.
- Bosetti, C., E. Lucenteforte, D. T. Silverman, G. Petersen, P. M. Bracci, B. T. Ji, E. Negri, *et al.* "Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer: An Analysis from the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (Panc4)." [In eng]. *Ann Oncol* 23, no. 7 (Jul 2012): 1880-8.
- Brand, R. E., B. M. Nolen, H. J. Zeh, P. J. Allen, M. A. Eloubeidi, M. Goldberg, E. Elton, *et al.* "Serum Biomarker Panels for the Detection of Pancreatic Cancer." *Clin Cancer Res* 17, no. 4 (Feb 15 2011): 805-16.
- Buchler, M. W., J. Werner, and J. Weitz. "R0 in Pancreatic Cancer Surgery: Surgery, Pathology, Biology, or Definition Matters?" [In eng]. *Ann Surg* 251, no. 6 (Jun 2010): 1011-2.
- Camp, R. L., V. Neumeister, and D. L. Rimm. "A Decade of Tissue Microarrays: Progress in the Discovery and Validation of Cancer Biomarkers." [In eng]. *J Clin Oncol* 26, no. 34 (Dec 1 2008): 5630-7.
- Chang, D. T., C. H. Chapman, J. A. Norton, B. Visser, G. A. Fisher, P. Kunz, J. M. Ford, A. C. Koong, and R. K. Pai. "Expression of P16(Ink4a) but Not Hypoxia Markers or Poly Adenosine Diphosphate-Ribose Polymerase Is Associated with Improved Survival in Patients with Pancreatic Adenocarcinoma." [In eng]. *Cancer* 116, no. 22 (Nov 15 2010): 5179-87.
- Chang, Z., H. Ju, J. Ling, Z. Zhuang, Z. Li, H. Wang, J. B. Fleming, *et al.* "Cooperativity of Oncogenic K-Ras and Downregulated P16/Ink4a in Human Pancreatic Tumorigenesis." [In eng]. *PLoS One* 9, no. 7 (2014): e101452.

- Chen, G., K. Sircar, A. Aprikian, A. Potti, D. Goltzman, and S. A. Rabbani. "Expression of Rankl/Rank/Opg in Primary and Metastatic Human Prostate Cancer as Markers of Disease Stage and Functional Regulation." [In eng]. *Cancer* 107, no. 2 (Jul 15 2006): 289-98.
- Cobrinik, D., S. F. Dowdy, P. W. Hinds, S. Mittnacht, and R. A. Weinberg. "The Retinoblastoma Protein and the Regulation of Cell Cycling." [In eng]. *Trends Biochem Sci* 17, no. 8 (Aug 1992): 312-5.
- Cody, J. J., A. A. Rivera, G. R. Lyons, S. W. Yang, M. Wang, J. W. Ashley, S. Meleth, *et al.* "Expression of Osteoprotegerin from a Replicating Adenovirus Inhibits the Progression of Prostate Cancer Bone Metastases in a Murine Model." [In eng]. *Lab Invest* 93, no. 3 (Mar 2013): 268-78.
- Corey, E., L. G. Brown, J. A. Kiefer, J. E. Quinn, T. E. Pitts, J. M. Blair, and R. L. Vessella. "Osteoprotegerin in Prostate Cancer Bone Metastasis." [In eng]. *Cancer Res* 65, no. 5 (Mar 1 2005): 1710-8.
- Cui, T., Y. Chen, T. Knosel, L. Yang, K. Zoller, K. Galler, A. Berndt, *et al.* "Human Complement Factor H Is a Novel Diagnostic Marker for Lung Adenocarcinoma." [In eng]. *Int J Oncol* 39, no. 1 (Jul 2011): 161-8.
- Eckelman, B. P., G. S. Salvesen, and F. L. Scott. "Human Inhibitor of Apoptosis Proteins: Why Xiap Is the Black Sheep of the Family." [In eng]. *EMBO Rep* 7, no. 10 (Oct 2006): 988-94.
- Edison, N., T. H. Reingewertz, Y. Gottfried, T. Lev, D. Zuri, I. Maniv, M. J. Carp, *et al.* "Peptides Mimicking the Unique Arts-Xiap Binding Site Promote Apoptotic Cell Death in Cultured Cancer Cells." [In eng]. *Clin Cancer Res* 18, no. 9 (May 1 2012): 2569-78.
- Edison, N., D. Zuri, I. Maniv, B. Bornstein, T. Lev, Y. Gottfried, S. Kemeny, *et al.* "The Iap-Antagonist Arts Initiates Caspase Activation Upstream of Cytochrome C and Smac/Diablo." [In eng]. *Cell Death Differ* 19, no. 2 (Feb 2012): 356-68.
- Elhasid, R., and S. Larisch. "Arts-Based Anticancer Therapy: Taking Aim at Cancer Stem Cells." [In eng]. *Future Oncol* 7, no. 10 (Oct 2011): 1185-94.
- Elhasid, R., D. Sahar, A. Merling, Y. Zivony, A. Rotem, M. Ben-Arush, S. Izraeli, D. Bercovich, and S. Larisch. "Mitochondrial Pro-Apoptotic Arts Protein Is Lost in the Majority of Acute Lymphoblastic Leukemia Patients." [In eng]. *Oncogene* 23, no. 32 (Jul 15 2004): 5468-75.
- Emery, J. G., P. McDonnell, M. B. Burke, K. C. Deen, S. Lyn, C. Silverman, E. Dul, *et al.* "Osteoprotegerin Is a Receptor for the Cytotoxic Ligand Trail." [In eng]. *J Biol Chem* 273, no. 23 (Jun 5 1998): 14363-7.
- Ferrone, C. R., M. W. Kattan, J. S. Tomlinson, S. P. Thayer, M. F. Brennan, and A. L. Warshaw. "Validation of a Postresection Pancreatic Adenocarcinoma Nomogram for Disease-Specific Survival." [In eng]. *J Clin Oncol* 23, no. 30 (Oct 20 2005): 7529-35.
- Fukushima, N., N. Sato, T. Ueki, C. Rosty, K. M. Walter, R. E. Wilentz, C. J. Yeo, R. H. Hruban, and M. Goggins. "Aberrant Methylation of Preproenkephalin and P16 Genes in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia and Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." [In eng]. *Am J Pathol* 160, no. 5 (May 2002): 1573-81.
- Gapstur, S. M., E. J. Jacobs, A. Deka, M. L. McCullough, A. V. Patel, and M. J. Thun. "Association of Alcohol Intake with Pancreatic Cancer Mortality in Never Smokers." [In eng]. *Arch Intern Med* 171, no. 5 (Mar 14 2011): 444-51.
- Garcia-Fernandez, M., H. Kissel, S. Brown, T. Gorenc, A. J. Schile, S. Rafii, S. Larisch, and H. Steller. "Sept4/Arts Is Required for Stem Cell Apoptosis and Tumor Suppression." [In eng]. *Genes Dev* 24, no. 20 (Oct 15 2010): 2282-93.

- Garrison, J. B., R. G. Correa, M. Gerlic, K. W. Yip, A. Krieg, C. M. Tamble, R. Shi, *et al.* "Arts and Siah Collaborate in a Pathway for Xiap Degradation." [In eng]. *Mol Cell* 41, no. 1 (Jan 7 2011): 107-16.
- Geng, M., H. Xu, R. Ren, Q. Qu, C. Shangguan, J. Wu, J. Jiang, H. Li, and W. Cao. "Prognostic Value of Clinicopathological Characteristics in Patients with Pancreatic Cancer." *Chin J Cancer Res* 27, no. 5 (Oct 2015): 509-15.
- Goldstein, A. M. "Familial Melanoma, Pancreatic Cancer and Germline Cdkn2a Mutations." [In eng]. *Hum Mutat* 23, no. 6 (Jun 2004): 630.
- Gottfried, Y., E. Voldavsky, L. Yodko, E. Sabo, O. Ben-Itzhak, and S. Larisch. "Expression of the Pro-Apoptotic Protein Arts in Astrocytic Tumors: Correlation with Malignancy Grade and Survival Rate." [In eng]. *Cancer* 101, no. 11 (Dec 1 2004): 2614-21.
- Graham, A. D., D. Faratian, F. Rae, and J. S. Thomas. "Tissue Microarray Technology in the Routine Assessment of Her-2 Status in Invasive Breast Cancer: A Prospective Study of the Use of Immunohistochemistry and Fluorescence in Situ Hybridization." [In eng]. *Histopathology* 52, no. 7 (Jun 2008): 847-55.
- Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Bishop K, Kosary CL, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER Cancer Statistics Review, 1975-2014, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2014/, based on November 2016 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2017.
- Hamidov, Z., A. Altendorf-Hofmann, Y. Chen, U. Settmacher, I. Petersen, and T. Knosel. "Reduced Expression of Desmocollin 2 Is an Independent Prognostic Biomarker for Shorter Patients Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." [In eng]. *J Clin Pathol* 64, no. 11 (Nov 2011): 990-4.
- Hatfield, D. R., F. H. DeLand, and Y. Maruyama. "Skeletal Metastases in Pancreatic Carcinoma: Study by Isotopic Bone Scanning." [In eng]. *Oncology* 33, no. 1 (1976): 44-7.
- Hezel, A. F., A. C. Kimmelman, B. Z. Stanger, N. Bardeesy, and R. A. Depinho. "Genetics and Biology of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." [In eng]. *Genes Dev* 20, no. 10 (May 15 2006): 1218-49.
- Holen, I., P. I. Croucher, F. C. Hamdy, and C. L. Eaton. "Osteoprotegerin (Opg) Is a Survival Factor for Human Prostate Cancer Cells." [In eng]. *Cancer Res* 62, no. 6 (Mar 15 2002): 1619-23.
- Holoch, P. A., and T. S. Griffith. "Tnf-Related Apoptosis-Inducing Ligand (Trail): A New Path to Anti-Cancer Therapies." [In eng]. *Eur J Pharmacol* 625, no. 1-3 (Dec 25 2009): 63-72.
- Hruban, R. H., M. Goggins, J. Parsons, and S. E. Kern. "Progression Model for Pancreatic Cancer." [In eng]. *Clin Cancer Res* 6, no. 8 (Aug 2000): 2969-72.
- Hruban, R. H., C. Iacobuzio-Donahue, R. E. Wilentz, M. Goggins, and S. E. Kern. "Molecular Pathology of Pancreatic Cancer." [In eng]. *Cancer J* 7, no. 4 (Jul-Aug 2001): 251-8.
- Hustinx, S. R., L. M. Leoni, C. J. Yeo, P. N. Brown, M. Goggins, S. E. Kern, R. H. Hruban, and A. Maitra. "Concordant Loss of Mtap and P16/Cdkn2a Expression in Pancreatic Intraepithelial Neoplasia: Evidence of Homozygous Deletion in a Noninvasive Precursor Lesion." [In eng]. *Mod Pathol* 18, no. 7 (Jul 2005): 959-63.
- Iguchi, H., M. Yasuda, T. Matsuo, T. Sumii, and A. Funakoshi. "[Clinical Features and Management of Pancreatic Cancer with Bone Metastases]." [In jpn]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi* 101, no. 8 (Aug 2004): 872-8.

- Jeong, J., Y. N. Park, J. S. Park, D. S. Yoon, H. S. Chi, and B. R. Kim. "Clinical Significance of P16 Protein Expression Loss and Aberrant P53 Protein Expression in Pancreatic Cancer." [In eng]. *Yonsei Med J* 46, no. 4 (Aug 31 2005): 519-25.
- Jiang, S. H., Y. Wang, J. Y. Yang, J. Li, M. X. Feng, Y. H. Wang, X. M. Yang, *et al.* "Overexpressed Edil3 Predicts Poor Prognosis and Promotes Anchorage-Independent Tumor Growth in Human Pancreatic Cancer." [In Eng]. *Oncotarget* (Dec 28 2015).
- Jones, S., X. Zhang, D. W. Parsons, J. C. Lin, R. J. Leary, P. Angenendt, P. Mankoo, *et al.* "Core Signaling Pathways in Human Pancreatic Cancers Revealed by Global Genomic Analyses." [In eng]. *Science* 321, no. 5897 (Sep 26 2008): 1801-6.
- Kanda, M., H. Matthaei, J. Wu, S. M. Hong, J. Yu, M. Borges, R. H. Hruban, *et al.* "Presence of Somatic Mutations in Most Early-Stage Pancreatic Intraepithelial Neoplasia." [In eng]. *Gastroenterology* 142, no. 4 (Apr 2012): 730-33 e9.
- Kanzaki, H., A. Ohtaki, F. K. Merchant, M. I. Greene, and R. Murali. "Mutations in K-Ras Linked to Levels of Osteoprotegerin and Sensitivity to Trail-Induced Cell Death in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Cells." [In eng]. *Exp Mol Pathol* 94, no. 2 (Apr 2013): 372-9.
- Katragadda, L., B. Z. Carter, and G. Borthakur. "Xiap Antisense Therapy with Aeg 35156 in Acute Myeloid Leukemia." [In eng]. *Expert Opin Investig Drugs* 22, no. 5 (May 2013): 663-70.
- Knosel, T., A. Altendorf-Hofmann, L. Lindner, R. Issels, H. Hermeking, G. Schuebbe, S. Gibis, *et al.* "Loss of P16(Ink4a) Is Associated with Reduced Patient Survival in Soft Tissue Tumours, and Indicates a Senescence Barrier." [In eng]. *J Clin Pathol* 67, no. 7 (Jul 2014): 592-8.
- Knosel, T., A. Emde, K. Schluns, Y. Chen, K. Jurchott, M. Krause, M. Dietel, and I. Petersen. "Immunoprofiles of 11 Biomarkers Using Tissue Microarrays Identify Prognostic Subgroups in Colorectal Cancer." [In eng]. *Neoplasia* 7, no. 8 (Aug 2005): 741-7.
- Krepela, E., P. Dankova, E. Moravcikova, A. Krepelova, J. Prochazka, J. Cermak, J. Schutzner, P. Zatloukal, and K. Benkova. "Increased Expression of Inhibitor of Apoptosis Proteins, Survivin and Xiap, in Non-Small Cell Lung Carcinoma." [In eng]. *Int J Oncol* 35, no. 6 (Dec 2009): 1449-62.
- Kriegel, L., J. Neumann, M. Vieth, F. R. Greten, S. Reu, A. Jung, and T. Kirchner. "Up and Downregulation of P16(Ink4a) Expression in Braf-Mutated Polyps/Adenomas Indicates a Senescence Barrier in the Serrated Route to Colon Cancer." [In eng]. *Mod Pathol* 24, no. 7 (Jul 2011): 1015-22.
- Kwon, B., B. S. Kim, H. R. Cho, J. E. Park, and B. S. Kwon. "Involvement of Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily(Tnfrsf) Members in the Pathogenesis of Inflammatory Diseases." [In eng]. *Exp Mol Med* 35, no. 1 (Feb 28 2003): 8-16.
- Lacey, D. L., E. Timms, H. L. Tan, M. J. Kelley, C. R. Dunstan, T. Burgess, R. Elliott, *et al.* "Osteoprotegerin Ligand Is a Cytokine That Regulates Osteoclast Differentiation and Activation." [In eng]. *Cell* 93, no. 2 (Apr 17 1998): 165-76.
- Lane, D., I. Matte, C. Laplante, P. Garde-Granger, C. Rancourt, and A. Piche. "Osteoprotegerin (Opg) Activates Integrin, Focal Adhesion Kinase (Fak), and Akt Signaling in Ovarian Cancer Cells to Attenuate Trail-Induced Apoptosis." [In eng]. *J Ovarian Res* 6, no. 1 (2013): 82.
- Larisch, S. "The Arts Connection: Role of Arts in Apoptosis and Cancer." [In eng]. *Cell Cycle* 3, no. 8 (Aug 2004): 1021-3.

- Larisch, S., Y. Yi, R. Lotan, H. Kerner, S. Eimerl, W. Tony Parks, Y. Gottfried, *et al.* "A Novel Mitochondrial Septin-Like Protein, Arts, Mediates Apoptosis Dependent on Its P-Loop Motif." [In eng]. *Nat Cell Biol* 2, no. 12 (Dec 2000): 915-21.
- Lee, J. W., Y. H. Soung, S. Young Kim, S. Woo Nam, W. Sang Park, J. Young Lee, N. Jin Yoo, and S. H. Lee. "Mutational Analysis of Proapoptotic Arts P-Loop Domain in Common Human Cancers." [In eng]. *Pathol Res Pract* 202, no. 2 (2006): 67-70.
- Li, D., K. Xie, R. Wolff, and J. L. Abbruzzese. "Pancreatic Cancer." [In eng]. *Lancet* 363, no. 9414 (Mar 27 2004): 1049-57.
- Li, G., Y. Ji, C. Liu, J. Li, and Y. Zhou. "Reduced Levels of P15ink4b, P16ink4a, P21cip1 and P27kip1 in Pancreatic Carcinoma." [In eng]. *Mol Med Rep* 5, no. 4 (Apr 2012): 1106-10.
- Li, J., L. J. Wang, X. Ying, S. X. Han, E. Bai, Y. Zhang, and Q. Zhu. "Immunodiagnostic Value of Combined Detection of Autoantibodies to Tumor-Associated Antigens as Biomarkers in Pancreatic Cancer." [In eng]. *Scand J Immunol* 75, no. 3 (Mar 2012): 342-9.
- Lipton, A., S. M. Ali, K. Leitzel, V. Chinchilli, L. Witters, L. Engle, D. Holloway, P. Bekker, and C. R. Dunstan. "Serum Osteoprotegerin Levels in Healthy Controls and Cancer Patients." [In eng]. *Clin Cancer Res* 8, no. 7 (Jul 2002): 2306-10.
- Luttges, J., and G. Kloppel. "Precancerous Conditions of Pancreatic Carcinoma." [In eng]. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 7, no. 6 (2000): 568-74.
- Luttges, J., S. Schemm, I. Vogel, J. Hedderich, B. Kremer, and G. Kloppel. "The Grade of Pancreatic Ductal Carcinoma Is an Independent Prognostic Factor and Is Superior to the Immunohistochemical Assessment of Proliferation." [In eng]. *J Pathol* 191, no. 2 (Jun 2000): 154-61.
- Lynch, H. T., J. F. Lynch, and S. J. Lanspa. "Familial Pancreatic Cancer." [In eng]. *Cancers (Basel)* 2, no. 4 (2010): 1861-83.
- Macara, I. G., R. Baldarelli, C. M. Field, M. Glotzer, Y. Hayashi, S. C. Hsu, M. B. Kennedy, *et al.* "Mammalian Septins Nomenclature." [In eng]. *Mol Biol Cell* 13, no. 12 (Dec 2002): 4111-3.
- Maitra, A., N. V. Adsay, P. Argani, C. Iacobuzio-Donahue, A. De Marzo, J. L. Cameron, C. J. Yeo, and R. H. Hruban. "Multicomponent Analysis of the Pancreatic Adenocarcinoma Progression Model Using a Pancreatic Intraepithelial Neoplasia Tissue Microarray." [In eng]. *Mod Pathol* 16, no. 9 (Sep 2003): 902-12.
- Mizutani, Y., H. Nakanishi, Y. N. Li, H. Matsubara, K. Yamamoto, N. Sato, T. Shiraishi, *et al.* "Overexpression of Xiap Expression in Renal Cell Carcinoma Predicts a Worse Prognosis." [In eng]. *Int J Oncol* 30, no. 4 (Apr 2007): 919-25.
- Moghanaki, D., R. Mick, E. E. Furth, D. Sohal, P. M. Salmon, A. Behbahani, A. K. Morgans, *et al.* "Resection Status, Age and Nodal Involvement Determine Survival among Patients Receiving Adjuvant Chemoradiotherapy in Pancreatic Adenocarcinoma." [In eng]. *JOP* 12, no. 5 (Sep 2011): 438-44.
- Moskaluk, C. A., R. H. Hruban, and S. E. Kern. "P16 and K-Ras Gene Mutations in the Intraductal Precursors of Human Pancreatic Adenocarcinoma." [In eng]. *Cancer Res* 57, no. 11 (Jun 1 1997): 2140-3.
- Neureiter, D., T. Jager, M. Ocker, and T. Kiesslich. "Epigenetics and Pancreatic Cancer: Pathophysiology and Novel Treatment Aspects." [In eng]. *World J Gastroenterol* 20, no. 24 (Jun 28 2014): 7830-48.

- Neville-Webbe, H. L., N. A. Cross, C. L. Eaton, R. Nyambo, C. A. Evans, R. E. Coleman, and I. Holen. "Osteoprotegerin (Opg) Produced by Bone Marrow Stromal Cells Protects Breast Cancer Cells from Trail-Induced Apoptosis." [In eng]. *Breast Cancer Res Treat* 86, no. 3 (Aug 2004): 269-79.
- Ney, J. T., I. Juhasz-Boess, F. Gruenhege, S. Graeber, R. M. Bohle, M. Pfreundschuh, E. F. Solomayer, and G. Assmann. "Genetic Polymorphism of the Opg Gene Associated with Breast Cancer." [In eng]. *BMC Cancer* 13 (2013): 40.
- Nolen, B. M., R. E. Brand, D. Prosser, L. Velikokhatnaya, P. J. Allen, H. J. Zeh, W. E. Grizzle, *et al.* "Prediagnostic Serum Biomarkers as Early Detection Tools for Pancreatic Cancer in a Large Prospective Cohort Study." [In eng]. *PLoS One* 9, no. 4 (2014): e94928.
- Ohtsubo, K., H. Watanabe, Y. Yamaguchi, Y. X. Hu, Y. Motoo, T. Okai, and N. Sawabu. "Abnormalities of Tumor Suppressor Gene P16 in Pancreatic Carcinoma: Immunohistochemical and Genetic Findings Compared with Clinicopathological Parameters." [In eng]. *J Gastroenterol* 38, no. 7 (2003): 663-71.
- Oshima, M., K. Okano, S. Muraki, R. Haba, T. Maeba, Y. Suzuki, and S. Yachida. "Immunohistochemically Detected Expression of 3 Major Genes (Cdkn2a/P16, Tp53, and Smad4/Dpc4) Strongly Predicts Survival in Patients with Resectable Pancreatic Cancer." [In eng]. *Ann Surg* 258, no. 2 (Aug 2013): 336-46.
- Piciucchi, M., G. Capurso, R. Valente, A. Larghi, L. Archibugi, M. Signoretti, S. Stigliano, *et al.* "Early Onset Pancreatic Cancer: Risk Factors, Presentation and Outcome." [In eng]. *Pancreatology* 15, no. 2 (Mar-Apr 2015): 151-5.
- Pinho, A. V., L. Chantrill, and I. Rooman. "Chronic Pancreatitis: A Path to Pancreatic Cancer." [In eng]. *Cancer Lett* 345, no. 2 (Apr 10 2014): 203-9.
- Rafiei, S., and S. V. Komarova. "Molecular Signaling Pathways Mediating Osteoclastogenesis Induced by Prostate Cancer Cells." [In eng]. *BMC Cancer* 13 (2013): 605.
- Raju, R. S., N. Coburn, N. Liu, J. M. Porter, S. J. Seung, M. C. Cheung, N. Goyert, *et al.* "A Population-Based Study of the Epidemiology of Pancreatic Cancer: A Brief Report." [In eng]. *Curr Oncol* 22, no. 6 (Dec 2015): e478-84.
- Raut, C. P., J. F. Tseng, C. C. Sun, H. Wang, R. A. Wolff, C. H. Crane, R. Hwang, *et al.* "Impact of Resection Status on Pattern of Failure and Survival after Pancreaticoduodenectomy for Pancreatic Adenocarcinoma." [In eng]. *Ann Surg* 246, no. 1 (Jul 2007): 52-60.
- Reid, M. D., B. Saka, S. Balci, A. S. Goldblum, and N. V. Adsay. "Molecular Genetics of Pancreatic Neoplasms and Their Morphologic Correlates: An Update on Recent Advances and Potential Diagnostic Applications." [In eng]. *Am J Clin Pathol* 141, no. 2 (Feb 2014): 168-80.
- Rochefort, M. M., J. S. Ankeny, B. E. Kadera, G. W. Donald, W. Isacoff, Z. A. Wainberg, O. J. Hines, *et al.* "Impact of Tumor Grade on Pancreatic Cancer Prognosis: Validation of a Novel Tnmg Staging System." [In eng]. *Ann Surg Oncol* 20, no. 13 (Dec 2013): 4322-9.
- Rosty, C., J. Geradts, N. Sato, R. E. Wilentz, H. Roberts, T. Sohn, J. L. Cameron, *et al.* "P16 Inactivation in Pancreatic Intraepithelial Neoplasias (Panins) Arising in Patients with Chronic Pancreatitis." [In eng]. *Am J Surg Pathol* 27, no. 12 (Dec 2003): 1495-501.

- Rozenblum, E., M. Schutte, M. Goggins, S. A. Hahn, S. Panzer, M. Zahurak, S. N. Goodman, *et al.* "Tumor-Suppressive Pathways in Pancreatic Carcinoma." [In eng]. *Cancer Res* 57, no. 9 (May 1 1997): 1731-4.
- Ryoo, H. D., and E. H. Baehrecke. "Distinct Death Mechanisms in Drosophila Development." [In eng]. *Curr Opin Cell Biol* 22, no. 6 (Dec 2010): 889-95.
- Sahu, R. P., S. Batra, P. K. Kandala, T. L. Brown, and S. K. Srivastava. "The Role of K-Ras Gene Mutation in Trail-Induced Apoptosis in Pancreatic and Lung Cancer Cell Lines." [In eng]. *Cancer Chemother Pharmacol* 67, no. 2 (Feb 2011): 481-7.
- Salvesen, G. S., and C. S. Duckett. "Iap Proteins: Blocking the Road to Death's Door." [In eng]. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, no. 6 (Jun 2002): 401-10.
- Satoh, K., K. Kaneko, M. Hirota, A. Masamune, A. Satoh, and T. Shimosegawa. "Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand and Its Receptor Expression and the Pathway of Apoptosis in Human Pancreatic Cancer." [In eng]. *Pancreas* 23, no. 3 (Oct 2001): 251-8.
- Schulte, A., N. Pandeya, B. Tran, J. Fawcett, L. Fritschi, H. A. Risch, P. M. Webb, D. C. Whiteman, and R. E. Neale. "Cigarette Smoking and Pancreatic Cancer Risk: More to the Story Than Just Pack-Years." [In eng]. *Eur J Cancer* 50, no. 5 (Mar 2014): 997-1003.
- Schutte, M., R. H. Hruban, J. Geradts, R. Maynard, W. Hilgers, S. K. Rabindran, C. A. Moskaluk, *et al.* "Abrogation of the Rb/P16 Tumor-Suppressive Pathway in Virtually All Pancreatic Carcinomas." [In eng]. *Cancer Res* 57, no. 15 (Aug 1 1997): 3126-30.
- Sedy, J., V. Bekiaris, and C. F. Ware. "Tumor Necrosis Factor Superfamily in Innate Immunity and Inflammation." [In eng]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, no. 4 (Apr 2015): a016279.
- Serrano, M., G. J. Hannon, and D. Beach. "A New Regulatory Motif in Cell-Cycle Control Causing Specific Inhibition of Cyclin D/Cdk4." [In eng]. *Nature* 366, no. 6456 (Dec 16 1993): 704-7.
- Shao, Y., H. Jiang, X. Wu, Y. Luo, and W. Tang. "P16 Promoter Hypermethylation Is Associated with Increased Risk of Nasopharyngeal Carcinoma." [In Eng]. *Mol Clin Oncol* 2, no. 6 (Nov 2014): 1121-24.
- Shi, Y. "Caspase Activation, Inhibition, and Reactivation: A Mechanistic View." [In eng]. *Protein Sci* 13, no. 8 (Aug 2004): 1979-87.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, and A. Jemal. "Cancer Statistics, 2017." [In eng]. *CA Cancer J Clin* 67, no. 1 (Jan 2017): 7-30.
- Simonet, W. S., D. L. Lacey, C. R. Dunstan, M. Kelley, M. S. Chang, R. Luthy, H. Q. Nguyen, *et al.* "Osteoprotegerin: A Novel Secreted Protein Involved in the Regulation of Bone Density." [In eng]. *Cell* 89, no. 2 (Apr 18 1997): 309-19.
- Singh, P., R. Srinivasan, and J. D. Wig. "Major Molecular Markers in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma and Their Roles in Screening, Diagnosis, Prognosis, and Treatment." [In eng]. *Pancreas* 40, no. 5 (Jul 2011): 644-52.
- Singh, S., S. J. Tang, J. Sreenarasimhaiah, L. F. Lara, and A. Siddiqui. "The Clinical Utility and Limitations of Serum Carbohydrate Antigen (Ca19-9) as a Diagnostic Tool for Pancreatic Cancer and Cholangiocarcinoma." [In eng]. *Dig Dis Sci* 56, no. 8 (Aug 2011): 2491-6.
- Stark, A. P., G. D. Sacks, M. M. Rochefort, T. R. Donahue, H. A. Reber, J. S. Tomlinson, D. W. Dawson, G. Eibl, and O. J. Hines. "Long-Term Survival in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma." [In Eng]. *Surgery* (Feb 1 2016).

- Steller, H. "Regulation of Apoptosis in Drosophila." [In eng]. *Cell Death Differ* 15, no. 7 (Jul 2008): 1132-8.
- Stuckey, D. W., and K. Shah. "Trail on Trial: Preclinical Advances in Cancer Therapy." [In eng]. *Trends Mol Med* 19, no. 11 (Nov 2013): 685-94.
- Tam, K. W., W. Zhang, J. Soh, V. Stastny, M. Chen, H. Sun, K. Thu, *et al.* "Cdkn2a/P16 Inactivation Mechanisms and Their Relationship to Smoke Exposure and Molecular Features in Non-Small-Cell Lung Cancer." [In eng]. *J Thorac Oncol* 8, no. 11 (Nov 2013): 1378-88.
- Torre, L. A., F. Bray, R. L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, and A. Jemal. "Global Cancer Statistics, 2012." [In eng]. *CA Cancer J Clin* 65, no. 2 (Mar 2015): 87-108.
- Tsukamoto, S., T. Ishikawa, S. Iida, M. Ishiguro, K. Mogushi, H. Mizushima, H. Uetake, H. Tanaka, and K. Sugihara. "Clinical Significance of Osteoprotegerin Expression in Human Colorectal Cancer." [In eng]. *Clin Cancer Res* 17, no. 8 (Apr 15 2011): 2444-50.
- Versteijne, E., C. H. van Eijck, C. J. Punt, M. Suker, A. H. Zwinderman, M. A. Dohmen, K. B. Groothuis, *et al.* "Preoperative Radiochemotherapy Versus Immediate Surgery for Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer (Preopanc Trial): Study Protocol for a Multicentre Randomized Controlled Trial." [In eng]. *Trials* 17, no. 1 (Mar 09 2016): 127.
- Vrieling, A., H. B. Bueno-de-Mesquita, H. C. Boshuizen, D. S. Michaud, M. T. Severinsen, K. Overvad, A. Olsen, *et al.* "Cigarette Smoking, Environmental Tobacco Smoke Exposure and Pancreatic Cancer Risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition." [In eng]. *Int J Cancer* 126, no. 10 (May 15 2010): 2394-403.
- Wang, L., L. Tang, R. Xie, W. Nie, L. Chen, and X. Guan. "P16 Promoter Hypermethylation Is Associated with Increased Breast Cancer Risk." [In eng]. *Mol Med Rep* 6, no. 4 (Oct 2012): 904-8.
- Weichhaus, M., P. Segaran, A. Renaud, D. Geerts, and L. Connelly. "Osteoprotegerin Expression in Triple-Negative Breast Cancer Cells Promotes Metastasis." [In eng]. *Cancer Med* 3, no. 5 (Oct 2014): 1112-25.
- Williams, J. L., A. H. Nguyen, M. Rochefort, V. R. Muthusamy, Z. A. Wainberg, D. W. Dawson, J. S. Tomlinson, *et al.* "Pancreatic Cancer Patients with Lymph Node Involvement by Direct Tumor Extension Have Similar Survival to Those with Node-Negative Disease." [In eng]. *J Surg Oncol* 112, no. 4 (Sep 2015): 396-402.
- Xiang, J. F., W. Q. Wang, L. Liu, H. X. Xu, C. T. Wu, J. X. Yang, Z. H. Qi, *et al.* "Mutant P53 Determines Pancreatic Cancer Poor Prognosis to Pancreatectomy through Upregulation of Cavin-1 in Patients with Preoperative Serum Ca19-9 \geq 1,000 U/MI." [In eng]. *Sci Rep* 6 (Jan 12 2016): 19222.
- Yachida, S., and C. A. Iacobuzio-Donahue. "Evolution and Dynamics of Pancreatic Cancer Progression." [In eng]. *Oncogene* 32, no. 45 (Nov 7 2013): 5253-60.
- Yadav, D., and A. B. Lowenfels. "The Epidemiology of Pancreatitis and Pancreatic Cancer." [In eng]. *Gastroenterology* 144, no. 6 (Jun 2013): 1252-61.
- Yagita, H., K. Takeda, Y. Hayakawa, M. J. Smyth, and K. Okumura. "Trail and Its Receptors as Targets for Cancer Therapy." [In eng]. *Cancer Sci* 95, no. 10 (Oct 2004): 777-83.

- Yonou, H., Y. Horiguchi, Y. Ohno, K. Namiki, K. Yoshioka, M. Ohori, T. Hatano, and M. Tachibana. "Prostate-Specific Antigen Stimulates Osteoprotegerin Production and Inhibits Receptor Activator of Nuclear Factor-KappaB Ligand Expression by Human Osteoblasts." [In eng]. *Prostate* 67, no. 8 (Jun 1 2007): 840-8.
- Yuan, K., Y. Sun, T. Zhou, J. McDonald, and Y. Chen. "Parp-1 Regulates Resistance of Pancreatic Cancer to Trail Therapy." [In eng]. *Clin Cancer Res* 19, no. 17 (Sep 1 2013): 4750-9.
- Zauli, G., E. Rimondi, and P. Secchiero. "Soluble Trail Does Not Impair the Anti-Osteoclastic Activity of Osteoprotegerin." [In eng]. *J Cell Mol Med* 12, no. 3 (Jun 2008): 1063-5.
- Zhou, S., W. Ye, Q. Shao, Y. Qi, M. Zhang, and J. Liang. "Prognostic Significance of Xiap and Nf-KappaB Expression in Esophageal Carcinoma with Postoperative Radiotherapy." [In eng]. *World J Surg Oncol* 11 (2013): 288.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

ALL	Akutes lymphatisches Lymphom
ARTS	Apoptosis-related-protein in the TGF-beta signaling pathway
BRCA2	Breat Cancer 2
CA 19-9	Carbohydrate-Antigen 19-9
CDK 4/6	Cyclin-D abhängigen Kinasen 4 + 6
FAMM-Syndrom	Familial Atypical Multiple Melanoma Syndrom
IAP	Inhibitoren der Apoptotischen Proteine
KRAS	v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
OPG	Osteoprotegerin
PanIN	pankreatisch intraduktale Neubildungen
PDAC	Pankreatisch duktales Adenokarzinom
p16	CDKN2A, Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
RANK	Receptor Activator of NF-kB
RANKL	Receptor Activator of NF-kB- Ligand
RCI	Robert-Koch-Institut
SMAD/DPC4	SMAD family member 4
TGF-beta	Transforming Growth Factor beta
TNFRSF	Tumor-Nekrosen-Faktor-Rezeptor-Superfamilie
TMA	Tissue Micro-Array
TRAIL	Tumor Nekrosis Factor Related Inducin Ligand
TP53	Encoding the p53 Protein
UEZ	Überlebenszeit
UICC	Union internationale contre le cancer = Internationale Vereinigung gegen Krebs
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis protei

8.2. Danksagung

Ich danke sehr Herrn Prof. Dr. Thomas Knösel für seine enorme Hilfsbereitschaft bei allen Fragen, seine Geduld und für dieses Doktorarbeitsthema.

Mein Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. Dr. Christian Pilarsky für das Überlassen der klinischen Daten und seine Unterstützung.

Ich bedanke mich bei Frau PD Dr. Annelore Altendorf-Hofmann für ihre großartige Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Ich danke meiner wunderbaren Familie für ihr Vertrauen, ihre Unterstützung und ihre Liebe.

8.3. Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Ludwigs-Maximilian-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:

- Professor Dr. med. Thomas Knösel
- Professor Dr. phil. nat. et rer. medic. habil. Christian Pilarsky
- PD Dr. Annelore Altendorf-Hofmann

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

München, 05.12.2018

Ort, Datum

Karoline Fremerey

Unterschrift Doktorandin